

LINEU ROBERTO DA SILVA

**PESQUISA DE *ESCHERICHIA COLI* 0157:H7 EM BOVINOS
ABATIDOS EM MATADOURO FRIGORÍFICO
DE CURITIBA - PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Curso de Medicina Veterinária, da Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Waldir Hamann

CURITIBA

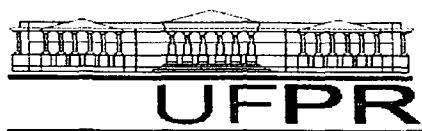
2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**PESQUISA DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EM BOVINOS ABATIDOS EM
MATADOURO FRIGORÍFICO DE CURITIBA - PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal do Paraná como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Veterinárias
Orientador: Prof.^o Dr.^o Waldir Hamann

Curitiba
2002



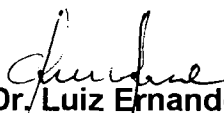
DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **LINEU ROBERTO DA SILVA** defendeu sua Dissertação de Mestrado junto ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná em **10/05/2002** tendo sido aprovado com conceito “A,” estando seu diploma em tramite junto a essa Universidade.

Título da Dissertação de Mestrado: “Pesquisa de Escherichia coli 0157:H7 em Bovinos Abatidos em Matadouro Frigorífico de Curitiba - Paraná”.

Curitiba, 10 de maio de 2002




Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki
Coordenador do CPGCV

“Considerem a diferença de tamanho entre algumas das menores e das maiores criaturas existentes na Terra. Uma pequena bactéria pesa 0,00000000001 grama. A Baleia Azul pesa cerca de 100.000.000 gramas. Mas mesmo assim uma bactéria é capaz de matar uma baleia. É tão grande a capacidade de adaptação e a versatilidade dos microrganismos, comparados aos seres humanos e outros organismos tidos como “superiores”, que eles sem dúvida continuarão a colonizar e alterar a superfície da Terra logo depois que nós e o resto de nossos cohabitantes deixarmos a cena para sempre. Os micróbios, e não os macróbios, dominam o mundo”

Bernard Dixon.

Para Eliane, minha amada esposa,
Humberto (*In memoriam*) e Ana Maria,
meus pais, e meu filho Roberto, que
encontre o seu caminho na vida.

AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer a muitas pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho:

Às minhas colegas do LACEN-PR, Ana Maria Senff, Carmem Lúcia Gomez Souza, Denise Bonato Berto, Letícia de Queiroz Castilhos, Sônia Maria de Souza Santos Farah e Wanda Sikorski Moscalewski.

Aos meus colegas do Ministério da Agricultura, Valmir Kowalewski e Caroline Peters Pigatto.

Aos meus colegas do Centro de Saúde Ambiental, Gisélia Rúbio , Natal Jatai de Camargo, Edla Maria Rigoni, Isaias Cantóia Luis, Themis Valéria Baptista de Souza , Luciane Meri Czuby, Sandra Regina Escorsato Garcia , Paulo Guerra, e Nereu Henrique Mansano.

Aos meus colegas do Ministério da Saúde , Moacir Gerolamo e Jurandir Girardi.

Aos meus colegas de curso Márcia, Patrícia Pimenta de Sillos, Giuliana Kasecker, Juliana Werner e Marcos Vinicius Tranquillim.

Ao professor Waldir Hamann, meu orientador, Maria Simone Utida dos Santos da biblioteca do Setor de Ciências Agrárias UFPR , Marcia Lopes Siqueira e Jean Rosa Lernernier da biblioteca da SESA - Pr e a Dra.Kinue Irino do Instituto Adolfo Lutz.

Muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	X
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1. Histórico.....	17
3.2. O Agente Etiológico.....	19
3.3. Dados Epidemiológicos.....	21
3.4. Origem do Sorotipo O157:H7	35
3.5. Fatores de virulência.....	
3.6. Mecanismos de Patogenicidade e Manifestações Clínicas	47
3.7. Reservatório	56
3.8. Manifestações Clínicas em Animais	66
3.8.1. Bovinos	66
3.8.2. Cães.....	68
3.8.3. Suínos.....	68
3.8.4. Coelho.....	69
3.9. Mecanismos de Transmissão	69
3.10. STEC não – O157	77
3.11. Sobrevivência nos Alimentos e Ambiente.....	80
3.12. Medidas De Controle	85
3.13. Métodos de detecção	89
4. METODOLOGIA	102
4.1. Origem das amostras.....	102
4.2. Tamanho da amostra mínima.....	102
4.3. Obtenção das amostras.....	103
4.3.1. Amostras fecais.....	103
4.3.2. Contaminação de carcaça:.....	104
4.4. Cultura referencial	105
4.5. Metodologia Analítica	105
4.5.1. Amostras fecais.....	106
4.5.1.1. Fase de isolamento em meio seletivo:.....	106
4.5.1.2. Fase de identificação presuntiva.....	106
4.5.1.3. Fase de caracterização complementar:	106
4.5.1.4. Provas diferenciais para Escherichia Hermanii.....	107
4.5.1.5. Caracterização do sorotipo O157:H7	107
4.6. Contaminação da carcaça	107
4.6.1 Contaminação por E. coli genérica.....	107
4.6.1.1. Metodologia analítica:	108
4.6.2. Isolamento de E. coli O157:H7 em carcaça.....	108
4.7. Metodologia estatística	112
5. RESULTADOS	113
6. DISCUSSÃO	114

7. CONCLUSÕES:	125
8. RECOMENDAÇÕES.....	126
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
ANEXOS	137
ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO MACCONKEY sorbitol	138
ANEXO 2 – COMPOSIÇÃO DO MEIO CARY BLAIR.....	139
ANEXO 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO MILI	140
ANEXO 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO E.P.M.	141
ANEXO 5 – COMPOSIÇÃO DO MEIO A.D.P.T.	142

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

- A/E - lesão "attaching and effacing"
- eae - gene codificador da intimina
- EA-AGGE - *E. coli* enteroaderente agregativa
- EHEC - *E. coli* enterohemorrágica
- EIEC - *E. coli* enteroinvasiva
- EPEC - *E. coli* enteropatogênica
- ETEC - *E. coli* enterotoxigênica
- ehxA - gene codificador da enterohemolisina
- Ehly - enterohemolisina
- EspP - serina protease
- esc - gene codificador do sistema de secreção tipo III
- esp - gene codificador das proteínas EspA , EspB , EspD
- Gb3 - globotriosil – ceramida
- Gb4 - globotetraosil – ceramida
- HUS (SUH) - síndrome urêmica hemolítica
- hly_a - gene codificador da hemolisina
- IC - intervalo de confiança
- O.R. - Odds Ratio
- Kb - kilobase
- KDa - kilodalton
- LEE - "Locus of enterocyte effacement"
- LPS - lipopolissacarídeo
- MDa - megadalton
- midA - gene codificador da enzima β - glicuronidase
- NMEC - *E. coli* responsável por meningite neonatal
- pb - pares de bases
- PCR - reação em cadeia da polimerase
- pEHEC - plasmídeo codificador da enterohemolisina
- rpos - gene codificador do fenótipo de jácido tolerância em *E. Coli*
- RTX - "repeated in toxin"
- sep - gene codificador do sistema de secreção tipo III
- SLT - "Shiga-Like Toxin"
- STEC - *E. coli* produtora de toxina Shiga
- STX - toxina Shiga
- STX1 - toxina Shiga 1
- STX2 - toxina Shiga 2
- stx - gene codificador de STX
- stx1 - gene codificador de STX 1
- stx2 - gene codificador de STX2
- tir - gene codificador da proteína TIR
- TIR - "translocated intimin receptor "
- TTP (PTT) - Púrpura trombótica trombocitopênica
- UPEC - *E. coli* uropatogênica

- UFC - unidade formadora de colônia
- VT - verotoxina
- VT1 - verotoxina 1
- VT2 - verotoxina 2

Abstract

With the objective for determining the presence of *Escherichia coli* O157: H7- the Shiga toxin bacteria producer at the herd cattle at the state of Paraná and the infection risk in cattle carcasses by the *Escherichia coli* O157:H7 sorotype were analysed faecal samples from carcass surface biopsies of one hundred bovine animals slaughtered in a slaughterhouse frigorific in the Curitiba metropolitan area-Paraná state. The method used for *E. coli* O157:H7 subtype isolating from fecal samples and surfaces biopsies was the medium in MacConkey sorbitol agar (SMAC). For evaluating the infection risk from the cattle carcasses was used a quick test: the Petrifilm® to identify the generic *E. coli* used as a fecal indicator. It was isolated an *E. coli* O157: H7 strain (1% prevalence, IC 95% 0,0 – 3,0%) carrier of the gene stx2 of an animal originated from a cattle farm at Ponta Grossa county – Paraná state. This case was the first sorotype isolating done in Paraná. In 41,0% (IC 95% 31,0 – 50,0%) of the bovine carcasses searched was identified *E. coli* generic surface infection. As conclusion, it has been comproved the *E. coli* O157: H7 presence potentially verotoxigenic at the cattle herd of the state from Paraná with risk of fecal carcass infection and human infection probabilities by this sorotype.

RESUMO

Com o objetivo de determinar a presença de *Escherichia coli* O157:H7 produtora de toxina siga no rebanho paranaense e o risco de contaminação de carcaças por este sorotipo de *Escherichia coli* foram analisadas amostras fecais e de esfregaços de superfície de carcaças de 100 bovinos abatidos em matadouro frigorífico da região metropolitana de Curitiba-Pr. O método utilizado para isolamento da *Escherichia coli* O157:H7 nas amostras fecais e nos esfregaços de superfície foi o ágar MacConkey sorbitol (SMAC). Para a avaliação do risco de contaminação das carcaças foi utilizada uma prova rápida, Petrifilm®, para identificação de *Escherichia coli* genérica utilizada como indicador de contaminação fecal. Foi isolada uma cepa de *Escherichia coli* O157:H7 (prevalência de 1,0%, IC95% 0,0 - 3,0%) portadora do gene *stx2* de um animal proveniente de uma fazenda de gado do município de Ponta Grossa – Pr, sendo, este o primeiro isolamento deste sorotipo no Paraná. Em 41,0% (IC95% 31,0 - 50,0%) das carcaças pesquisadas foi identificada contaminação superficial por *Escherichia coli* genérica. Como conclusão, esta comprovada a presença de *Escherichia coli* O157:H7 potencialmente verotoxigênica no rebanho bovino paranaense com alto risco de contaminação fecal de carcaças e possibilidade de infecções humanas por este sorotipo.

1 INTRODUÇÃO

Em 1982 o CDC (Centers for Disease Control and Prevention), instituição responsável pela vigilância epidemiológica nos EUA, investigou dois surtos de gastroenterite hemorrágica associados com a mesma cadeia de lanchonetes identificando uma cepa de *Escherichia coli* expressando o antígeno O157 e o antígeno H7 que não tinha sido previamente identificado como patógeno. Esta bactéria produzia uma toxina similar a toxina shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1.

O Conselho para Ciência Agrícola e Tecnologia, uma organização privada sem fins lucrativos, estimou em seu relatório datado de 1994, “Patógenos Transmitidos pelos Alimentos: Riscos e Conseqüências” que 9000 óbitos e uma incidência de 6,5 a 33 milhões de casos de doenças ocorrem nos Estados Unidos, a cada ano, relacionadas aos alimentos. O Departamento de Agricultura (USDA) do governo americano calculou os custos médicos e a perda de produtividade envolvidas com essas doenças em 6,5 a 34,9 bilhões de dólares anuais. O CDC estima que as doenças veiculadas por alimentos causam 5000 óbitos , 325000 hospitalizações e 76 milhões de casos anualmente nos EUA, incluídos 73480 casos de infecções por *E. coli* O157:H7 com 2168 hospitalizações e 61 óbitos .Calcula-se que apenas de 1 a 5% dos casos ocorridos são notificados. (MEAD *et al.*, 1999). Entre todos os agentes etiológicos, quatro são considerados prioritários pelo CDC por serem facilmente transmissíveis, multiplicarem-se rapidamente em alimentos, produzirem doença grave com grande prejuízo econômico em perda de produtividade e gastos médicos e alta incidência : *Salmonella* , *Campylobacter* , *Listéria* e *E. coli* O157:H7.

Escherichia coli é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente (VARNAM, 1991).

Escherichia coli é um bacilo gram – negativo não esporulado, fermenta a glicose produzindo ácido e gás e pertence a família *enterobacteriaceae*. As linhagens de *E. coli* patógenas para o homem são classificadas em sete grupos conforme suas características epidemiológicas , fatores de virulência e quadro clínico:

- a) EPEC (*E. coli* enteropatogenica clássica);
- b) EIEC (*E. coli* enteroinvasiva);
- c) ETEC (*E. coli* enterotoxigenica);
- d) EHEC (*E. coli* entero-hemorragica);
- e) EaggEC (*E. coli* enteroagregativa);
- f) UPEC (*E. coli* uropatogenica);
- g) NMEC (*E. coli* responsável por meningite neonatal). (SCHUCH, 1997)

A designação de EHEC foi inicialmente empregada para cepas O157:H7, implicadas como agente etiológico da colite hemorrágica porque *E. coli* O157:H7 é o sorotipo predominante em muitos países e o que foi primeiramente identificado. Entretanto mais de 150 sorotipos (O5:NM; O26:H11; O111:H8; O113:H21; O128:NM; O145:NM) entre outros compartilham o mesmo potencial patogênico. Nem todos os sorotipos produtores de toxina shiga (STEC) são patogênicos para o homem.(DUFFY *et al.*, 2001).

Os atributos que determinam a patogenicidade não são completamente conhecidos, no entanto fatores de colonização do intestino e outros genes de virulência estão associados. Alguns desses genes incluem os codificadores de enterohemolisina, gene *eae* e a ilha de patogenicidade LEE. (DUFFY *et al*, 2001).

Escherichia coli O157:H7 é atualmente a maior causa da colite hemorrágica na América do Norte. A colite hemorrágica é caracterizada clinicamente por dores abdominais severas e diarreia aguda, seguida de diarreia hemorrágica, diferindo das manifestações clínicas causadas por outros agentes invasores, pela grande quantidade de sangue nas fezes e ausência de febre. O período de incubação varia de dois a nove dias e a dose infectante é muito pequena (10 – 100) células.(COHEN, 1996).

Aproximadamente 10% dos pacientes com colite hemorrágica evolui para uma doença grave conhecida como síndrome urêmica hemolítica (SUH), caracterizada por lesão renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática. O mecanismo de patogenicidade está relacionado com a produção das shigatoxinas também chamadas verotoxinas (VT). Essas toxinas recebem esta denominação por suas atividade biológica em células vero, originárias de rim de macaco. São proteínas de alto peso molecular, sendo conhecidas as variantes STX1 ou VT1 e STX2 ou VT2. A produção das verotoxinas é determinada por dois fagos lisogênicos distintos. Essas citotoxinas são formadas por duas subunidades sendo uma delas responsável pela ligação com a fração 60S dos ribossomos dos enterócitos, inibindo a síntese protéica. (COHEN, 1996 e CERQUEIRA, 2000)

Dados atuais indicam que *E. coli* O157:H7 é a causa de 85 a 95% dos casos de síndrome urêmica hemolítica na América do Norte e outras cepas STEC não-O157 por outros 5 a 15%. Ainda que a SUH possa ocorrer em pessoas de qualquer idade, as crianças são as mais afetadas principalmente as menores de 5 anos. As principais manifestações clínicas são a insuficiência renal que afeta a maioria dos pacientes, palidez, hematomas e petéquias, hipertensão arterial e manifestações neurológicas como irritabilidade, letargia, convulsões e coma ocorrem em 25% dos afetados.(ARMSTRONG *et al.*, 1996 e ROSE; CHANT, 1998)

Na década de 50 e princípios de 60, a taxa de letalidade era de 30 a 40% para SUH. O diagnóstico precoce da enfermidade e o melhor manejo da insuficiência renal aguda e da anemia diminuiu a letalidade durante o período agudo sendo atualmente de 2 a 7%, porém em alguns surtos envolvendo idosos esta taxa é superior a 50%.(DUFFY *et al.*, 2001). Em torno de 5% dos casos de SUH evoluem para insuficiência renal crônica, exigindo procedimentos dialíticos ou transplante renal. Outros 30% continuam com microhematúria e graus variáveis de proteinúria, podendo desenvolver insuficiência renal crônica em lapsos variáveis de tempo.(COHEN, 1996)

A colite hemorrágica por *E. coli* O157:H7 e a síndrome urêmica hemolítica já foram identificadas em mais de 30 países de seis continentes. A maior incidência de SUH ocorre na Argentina onde a enfermidade é endêmica. São notificados mais de 300 casos anuais com um coeficiente de incidência de 22/100.000 crianças menores de cinco anos. (WHO, 1997 e LOPEZ *et al.*, 1998)

Varias espécies de animais domésticos foram identificados como hospedeiros do sorotipo O157:H7. O gado bovino é considerado seu principal reservatório, com

taxas de prevalência variando entre as regiões e conforme os métodos de pesquisa utilizados. (CERQUEIRA, 2000, COHEN, 1996 e PARK *et al.*, 1999)

A transmissão da doença se dá, principalmente, através de alimentos contaminados, especialmente carne bovina moída e leite não pasteurizado. A contaminação da água e a contaminação cruzada durante o preparo de alimentos são fatores importantes na transmissão. A bactéria é resistente aos meios ácidos e pode sobreviver em alimentos fermentados e vegetais frescos. (COHEN, 1996, MENG; DOYLE, 1998 e PARK *et al.*, 1999)

A infecção por *E. coli* O157:H7 não é doença de notificação obrigatória no Brasil e são poucos os estudos sobre o tema desenvolvidos em nosso país. Não existem estudos sobre a ocorrência de *E. coli* O157:H7 no Paraná, onde o sorotipo nunca foi isolado em alimentos, em animais hospedeiros ou em casos humanos.

2 OBJETIVOS

Identificar a presença da *E. coli* O157:H7 no rebanho bovino e o risco de contaminação de carcaças em matadouro por este sorotipo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico

Em 1955 a síndrome urêmica hemolítica foi primeiramente descrita e caracterizada por GASSER como um quadro de insuficiência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática (PARK *et al.*, 1999).

Em 1977, KONOWALCHUCK *et al.* citados por PARK *et al.* (1999), demonstram que certas cepas diarreicas de *E. coli* produziam uma citotoxina que pode matar células vero e as denominam verotoxinas (VT).

Em 1982 dois surtos de diarreia hemorrágica são investigados pelo C.D.C. (Centers for Disease Control and Prevention) nos Estados do Oregon e Michigan (E.U.A) associados com o consumo de hambúrguer de uma mesma cadeia de lanchonetes identificando uma cepa de *Escherichia coli*, expressando o antígeno O157 e o antígeno H7 que não tinha sido ainda identificado como patógeno (WELLS *et al.*, 1983 e ARMSTRONG *et al.*, 1996).

Em 1983, O'BRIEN *et al.* citados por ARMSTRONG *et al.* (1996) informam que um sorotipo *E. coli* O157:H7 é o responsável por um surto de colite hemorrágica nos EUA e produz uma toxina similar a toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1.

Em 1985, KARMALI *et al.* citados por PARK *et al.* (1999) propõem que as shigatoxinas produzidas por cepas de *Escherichia coli* (STEC) estão epidemiologicamente associadas com a síndrome urêmica hemolítica (SUH).

EM 1985, SCOTLAND *et al.* citados por PARK *et al.* (1999) demonstram que os genes que controlam a produção da shigatoxina 1 (STX 1) e shigatoxina 2 (STX2) são codificados por bacteriófagos em *E. coli*.

Em meados da década de 80, fica demonstrada a existência de um receptor celular para as toxinas STX1 e STX2: Galactose α - (1-4) – Galactose β - (1-4) glicose ceramida (Gb3) (PARK *et al.*, 1999).

Em 1986, TZIPORI *et al.* citados por PARK *et al.* (1999) observam que *E. coli* O157:H7 causa uma lesão intestinal denominada lesão A/E (attaching and effacing), conhecida previamente em *E. coli* enteropatogênica (EPEC).

Em 1987, LEVINE citado por O'BRIEN *et al.* (1998) sugere que cepas *E. coli* que provoquem lesão A/E, produzam STXs e apresentem um plasmídio de 60 – MDa sejam classificados em uma nova categoria denominada *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Em 1995, TZIPORI *et al.* citados por O'BRIEN *et al.* (1998) demonstram que uma proteína denominada intimina codificada pelo gene *eaeA* é necessária para que cepas EPEC causem as lesões A/E em suínos gnotobióticos.

Em 1996, MCDANIEL *et al.* citados por PARK *et al.* (1999) informam que as cepas EPEC e EHEC possuem ilhas de patogenicidade de 35 Kb contendo regiões implicadas na formação de lesões A/E, aparato de secreção tipo III e secreção de proteínas com funções desconhecidas.

Em 1995, KENNY *et al.* citados por PARK *et al.* (1999) informam que cepas EPEC possuem receptores “Tir” (translocated intimin receptor) que permitem a intimina aderir a superfície de células de mamíferos.

Em 1996, CALDERWOOD *et al.* citados por PARK *et al.*, 1999 propõe que as shiga-like-toxins (SLTs) ou verotoxinas (VTs) sejam denominadas shiga-toxins (STXs).

3.2 O Agente Etiológico

Escherichia é um gênero de família *Enterobacteraceae*. O gênero *Escherichia* tem seis espécies: *E. adecarboxylata* , *E. fergusonii* , *E. hermanii* , *E. vulneris* e *E. blattae*. (VARNAM,1991)

E. coli é um indicador de contaminação fecal importante na vigilância sanitária de alimentos , sendo o organismo anaeróbio facultativo mais comum no trato gastrointestinal dos mamíferos , embora a maioria não tenha ação patogênica em humanos e animais.(VARNAM,1991 e SCHUCH, 1997)

Atualmente são reconhecidos cinco tipos de *Escherichia coli* causadores de gastroenterite em humanos com distintos padrões clínicos, epidemiológicos, patogênicos e sorotipos. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroaderente agregativa (EA-AGGEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). (SCHUCH, 1997 e CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION, 2001a, 2001b, 2001c)

A sorotipificação da *Escherichia coli* utiliza o esquema de Kauffman-Kmipschildt Vahlne. A determinação do antígeno da parede celular Lipopolissacarideo "O" define o sorogrupo. O antígeno "H" define o sorotipo ou sorovar. (SCHUCH, 1997 e RIEMANN; CLIVER, 1998)

Os antígenos "O" são complexos lipopolissacarídicos termoestáveis que fazem parte da estrutura da parede celular. Os antígenos "H" são proteínas flagelares termolábeis e utilizadas na classificação em sorotipos dos sorogrupos "O" dos gêneros móveis. (SCHUCH, 1997)

Escherichia coli O157:H7 pertence ao grupo das *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC). *E. coli* O157:H7 é o mais conhecido destes sorotipos, embora muitos outros sorotipos façam parte das EHEC. (COHEN, 1996)

Como outras *E.coli* genéricas *Escherichia coli* O157:H7 apresenta as seguintes características : bastonete curto (1,1 – 1,5 um x 2,0 – 6,0 um), Gram negativo aparecendo isolados ou em pares em esfregaços corados. Não esporula, é oxidase negativa e realiza metabolismo respiratório e fermentativo. (SCHUCH, 1997)

Algumas características da *Escherichia coli* O157:H7 são específicas e são importantes em sua identificação : não fermenta o sorbitol e a ramnose em 24 horas; não produz a enzima B-D-glicuronidase ; possui atividade glutamato descarboxilase; não descarboxila a lisina e a ornitina; fermenta a rafinose e o dulcitol ; é sensível ao azul de bromotimol em altas temperaturas e não cresce ou cresce mal a 45.5° C. (SCHUCH, 1997)

Cepas de *Escherichia coli* produtoras de toxina shiga (STEC) são definidas como aquelas com capacidade de produzir shigatoxina tipo 1 (STX1), shigatoxina tipo 2 (STX2) ou uma variante desta, ou ambas as toxinas. Muitas cepas STEC também carregam um plasmídio de 90 Kb. *E coli* enterohemorrágica (EHEC) como *E. coli* O157:H7, não apenas tem estas duas características como também expressam a adesina intimina pelo gene *eae* (*E. coli* attaching and effacing) que está contido em um locus de 35 Kb (locus for enterocyte effacement) conhecido como região LEE. (MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998)

É aceito de modo geral que as cepas EHEC formam um subgrupo das cepas STEC por serem dotados de maior patogenicidade. Embora, existam informes de que amostras produtoras apenas de STX podem causar tanto a colite hemorrágica

como a SUH. (ACHESON *et al.*, 1998, NATARO; KAPER, 1998 e CERQUEIRA, 2000)

3.3 Dados Epidemiológicos

3.3.1 EUA

Desde 1982, mais de 100 surtos de infecção por *E. coli* O157 foram notificados nos EUA. Em 52% destes com fonte de infecção em alimentos de origem bovina, 16% com transmissão pessoa a pessoa, 14% através de alimentos de origem vegetal e frutas, 12% por água, e 5% via alimentos mistos. (WHO, 1997 e TAUXE, 1997).

A incidência de infecção por *E. coli* O157:H7 varia entre 0,03 a 4.99 casos/100000 habitantes, conforme as diversas fontes de dados. Dados mais recentes estimam esta variação em 1,4/100000 no estado da Geórgia a 8,0 /100000 em Minnesota (HEDBERG, 1997 e WHO, 1997)

Em 139 surtos por cepas O157:H7 no período de 1982 – 1996 acima de 3000 pessoas adoeceram com 22% dos casos hospitalizados. Destes, 6% evoluíram para SUH ou PTT com 0,6% de letalidade. (GRIFFIN, 1998)

Em 30.000 amostras de fezes em casos de gastroenterite no período de 1990 a 1992, 0,4% foram positivos para *E. coli* O157:H7 e 47% destes foram hospitalizados. (GRIFFIN, 1998)

Os casos de infecção por *E. coli* O157:H7 são mais comuns nos Estados do norte. A incidência é maior em crianças entre cinco e nove anos e adultos entre 50 e 59 anos e nos meses quentes do ano. (GRIFFIN, 1998)

Atualmente, a SUH é a principal causa de insuficiência renal aguda em crianças com uma incidência estimada de 1,7 / 100000 em crianças menores de cinco anos e a maioria dos casos tem como causa a infecção por *E. coli* O157:H7. A média de idade dos casos que evoluem para SUH é de seis anos e nas infecções sem SUH de 21 anos (BENDER *et al.*, 1998 e MAJKOWSKI, 1997)

O interesse do público aumentou grandemente quando um grande surto ocorreu em vários estados do oeste dos EUA com 700 casos e 4 óbitos. Atualmente ,o número de casos anuais estimados varia conforme a fonte entre 10000 e 73000 com 60 a 250 óbitos. (BENDER *et al.*, 2000, COHEN, 1996 e MEAD *et al.*, 1999)

O C.D.C. conduziu um estudo prospectivo entre agosto de 1982 e abril de 1984 que identificou 28 casos de infecção por *E. coli* O157:H7 em 11 Estados. (COHEN, 1996). Esta foi a primeira demonstração de que a colite hemorrágica causada por *E. coli* O157:H7 é uma doença esporádica disseminada pelos EUA. Outro estudo no Estado de Washington demonstrou que a infecção por *E. coli* O157:H7 é a quarta causa mais comum de diarreia bacteriana após *Salmonella*, *Campylobacter* e *Shigella*. Em estudos mais recentes , *E. coli* O157:H7 tem sido mais freqüentemente isolada que *Shigella*, sendo a segunda ou terceira mais comum bactéria enteropatogênica. (COHEN, 1996)

Em um estudo multicentrico, *E. coli* O157:H7 foi o patógeno mais freqüente em amostras fecais hemorrágicas. (COHEN, 1996)

As taxas de hospitalização em cinco estados sentinela (Califórnia, Connecticut , Geórgia , Minnesota e Oregon) em 1997 foram de 88% para infecções por *Listeria*, seguida de 29% para *E. coli* O157:H7 e de 21 % para *Salmonella*,

demonstrando a gravidade do quadro clínico das infecções por *E. coli* O157:H7. (PARK *et al.*, 1999)

3.3.2 Reino Unido

Em 1996 a incidência de infecção por *E. coli* O157:H7 na Inglaterra e País de Gales foi de 1,29/100000 habitantes enquanto em 1990 foi de 0,49/100000 com uma incidência média anual de 1,5/1000. Na Escócia a incidência anual de infecções por *E. coli* O157:H7 variou de 2,24/100000 em 1992 a 9,85/100000 em 1996, uma incidência média anual de 5,0/100000. (WHO, 1997 e SMITH *et al.*, 1998)

Em 22 de novembro de 1996 foi notificado e investigado um surto de *E. coli* O157:H7 em Lanarkshire na Escócia. Foram confirmados laboratorialmente 279 casos em pessoas com idade entre dois e 91 anos. 151 pessoas (31%) foram hospitalizadas e 20 pacientes faleceram, todos com mais de 65 anos. A cepa O157:H7 isolada produziu STX2 na pesquisa laboratorial e o veículo de transmissão foi à carne bovina. (AHMED, 1998)

Estudos sobre a síndrome urêmica hemolítica na Inglaterra e Gales mostram que 12% dos casos de infecção por STEC evoluem para SUH. (SMITH, 1998)

Como em muitos outros países a maioria dos casos de infecções por *E. coli* O157:H7 ocorre de maio a outubro com pico no final do verão e início do outono. (PARK *et al.*, 1999 e SMITH, 1998)

O número de casos de infecções por O157 confirmados em laboratório aumentou de um em 1982 para 1039 em 1995. O aumento de incidência observado na última década se deve à melhoria dos meios de diagnóstico e vigilância, mas

também, provavelmente, a um aumento real da frequência, uma vez que o número de surtos tem aumentado. (PARK *et al.*, 1999)

A severidade da doença provocada pelas infecções por O157 pode ser avaliada quando comparada com outras doenças infecciosas intestinais. Em 39 surtos por *E. coli* O157:H7 no Reino Unido, 30 % dos pacientes foram hospitalizados com uma letalidade de 3,7 %. Em surtos por outros enteropatógenos a taxa de hospitalização foi de 2% e a letalidade de 0,1%. (SMITH, 1998)

O principal mecanismo de transmissão foi a veiculação por alimentos e bebidas , transmissão direta por animais e pessoa a pessoa. Entre os alimentos implicados em surtos os mais frequentes foram a carne bovina, vegetais crus, leite sem pasteurização, queijo e iogurte. (SMITH, 1998 e WILLSHAW *et al.*, 1997)

A dose infectante estimada em diversos surtos é muito pequena, provavelmente menor que 100 organismos. Dois surtos em 1983 na Inglaterra e em 1984 na Escócia por *E. coli* O157:H7 foram os primeiros isolamentos de cepas STEC no Reino Unido. No período de 1983 a 1996 foram notificados 55 surtos por *E. coli* O157:H7 na Inglaterra e País de Gales. (SMITH, 1998)

Algumas infecções por *E. coli* O157:H7 estão associadas com viagens de habitantes do Reino Unido para países da Europa continental. A proporção de casos associados a estas viagens esta crescendo, principalmente em viagens para a Espanha, Grécia e Turquia.(SMITH, 1998)

No Reino Unido em 1996, predominou o fagotipo 2 produtor de STX2 entre os casos de infecção por *E. coli* O157:H7. Os primeiros estudos de prevalência para *E. coli* O157:H7 nos bovinos sadios encontraram prevalências menores de 1% em matadouros. Estudos mais recentes com metodologia mais aperfeiçoada

identificaram prevalências maiores. Estudos recentes mostraram 15,7% de prevalência em swabs retais de 4800 bovinos para O157:H7. Em um estudo prospectivo de um ano com amostras fecais de bovinos em matadouro no Reino Unido, *E. coli* O157:H7 foi isolada de 752 (15,7%) animais de um total de 4800. A prevalência foi maior na primavera e verão. (WILLSHAW, 1997, SMITH, 1998 e PARK *et al.*, 1999)

E. coli O157:H7 foi também detectada em 2,2% das ovelhas, mas não em suínos ou frangos. Estudos na Escócia detectaram 15 casos em 5237 bovinos (0,25%), mas não em ovelhas, suínos e outras espécies. Estudos mais recentes detectaram *E. coli* O157:H7 em caprinos, eqüinos, veados, cães, gansos e gaivotas. (SMITH, 1998)

Disseminação de animal para animal e para humanos pode ocorrer em ambientes rurais contaminados com estes organismos. Existe, claramente, um grande reservatório de *E. coli* O157:H7 em bovinos no Reino Unido. (SMITH, 1998)

O número de casos de infecções por cepas STEC em crianças em um estudo de 3 anos foi de 81, 97 e 110 casos com incidência maior entre 1 e 2 anos de idade. 72% desses casos foram causados pelo sorotipo O157:H7 e 28% por outros nove sorotipos. A maior proporção de casos de SUH no Reino Unido é causada por cepas O157:H7, embora outros sorotipos também estejam envolvidos. (SMITH, 1998 e DUFFY *et al.*, 2001)

3.3.3 Europa Continental

Na Europa continental o primeiro caso de infecção por *E. coli* O157:H7 foi identificado em 1987 na Bélgica. Desde então *Escherichia coli* O157:H7 foi isolada

em um grande número de países. Varias cepas se mostraram fermentadoras do sorbitol e não móveis sendo identificadas na Alemanha, República Tcheca, Hungria e Finlândia. (CAPRIOLI; TOZZI, 1998)

Vários estudos com casos de diarreia em diversos países identificaram infecção por cepas STEC em 0,9% de 22428 casos. Destes, 80% foram devidos a cepas não-O157. Dentre estas (19 sorogrupos) as cepas predominantes foram dos sorogrupos: O26 (16%), O103 (15%) e O111 (6%). Estes resultados são diferentes dos encontrados na América do Norte e Reino Unido onde *E. coli* O157:H7 predomina entre as cepas STEC. (CAPRIOLI; TOZZI, 1998)

Os surtos ocorrem com menos frequência na Europa Continental do que na América do Norte e Reino Unido. Em 17 surtos investigados entre 1977 e 1997, 12 (70%) foram causados por cepas O157, porém em nenhum desses casos a carne bovina foi identificada como o veículo de transmissão. O consumo de produtos lácteos não pasteurizados (queijo) ou a exposição ao ambiente contaminado (natação) foram os fatores de risco identificados. (CAPRIOLI; TOZZI, 1998)

Uma vez que os casos de SUH são mais facilmente identificáveis, pois exigem hospitalização, a incidência de SUH é considerada um bom indicador da frequência de infecções por STEC. Na Europa Continental as maiores incidências de SUH ocorrem na Alemanha com 19 casos para 100000 crianças até 15 anos, seguida da Holanda com 1,5/100000, Suíça com 1,5/100000 e Bélgica com 1,4/100000. Os países do Sul da Europa tem incidências menores de SUH nessa faixa etária sugerindo uma menor frequência de infecção por STEC. (WHO, 1997 e CAPRIOLI; TOZZI, 1998)

Estudos em diversos países (Holanda, França, Alemanha, República Tcheca, Itália e Bélgica) em pacientes com SUH mostraram a associação da síndrome com infecção por STEC (81%). Entre estes casos predominou o sorotipo O157:H7. A predominância da *Escherichia coli* O157:H7 nos casos de SUH, uma manifestação severa da infecção, e em surtos sugere uma maior virulência para este sorotipo. (WHO, 1997 e CAPRIOLI; TOZZI, 1998)

Na Europa continental, cepas STEC foram já isoladas de bovinos em 9 diferentes países (Áustria, Bélgica, Dinamarca, Alemanha, Itália, Eslovênia, Espanha, Suíça e Holanda), dentre estas a *E. coli* O157:H7. (WHO, 1997 e CAPRIOLI; TOZZI, 1999)

Em vários estudos a prevalência de cepas STEC em bovinos variou de 11 a 21%. *E coli* O157 foi encontrada em menos de 1% do total de animais examinados. Este achado confirma que na Europa Continental o sorogrupo O157 é minoritário a outros sorogrupos STEC como O26, O111, O103, O113 e O128 identificados nas fezes de bovinos em diversos países. (CAPRIOLI; TOZZI, 1998)

Os estudos referentes à Europa Continental em que pesem os diversos métodos de pesquisa utilizados, sugerem uma área de menor incidência quando comparada com a América do Norte e Reino Unido com casos predominando na Europa central por sorogrupos STEC Não-O157, ocorrência de cepas O157 fermentadoras do sorbitol e surtos associados aos produtos lácteos e exposições ambientais e não ao consumo de carne bovina. (CAPRIOLI; TOZZI, 1998)

3.3.4 Canadá

Infecções por STEC no Canadá têm sido monitoradas desde 1990. A maior incidência foi observada em 1995 com 5,1/100000 habitantes. No período de 1993 a 1995, 93% dos casos de STEC foram causados pelo sorogrupo O157 e nos últimos anos tem ocorrido um declínio da incidência em razão das atividades de controle implementadas. (SPIKA *et al.*, 1998)

Entre 316 surtos investigados, 70% ocorreram em domicílio com a principal fonte de infecção sendo a carne bovina moída, seguida do leite cru, sucos de frutas e água de beber. (WHO, 1997 e SPIKA *et al.*, 1998)

O maior surto de infecção pelo sorotipo O157:H7 notificado ocorreu em 1991 entre esquimós com 521 casos, 22 casos de SUH em crianças e 2 óbitos. (SPIKA, *et al.*, 1998)

As infecções por STEC no Canadá têm padrão sazonal com maior frequência nos meses de verão e maior incidência em áreas rurais, observando-se uma correlação com a densidade da população bovina. (SPIKA *et al.*, 1998)

3.3.5 Japão

No período de 1991 a 1995, 29 surtos de *E. coli* O157:H7 foram notificados no Japão. Entre maio e dezembro de 1996 vários surtos ocorreram, com 11826 casos e 19 óbitos. Entre estes, 16 surtos com 10275 casos ocorreram em escolas primárias. (MICHINO *et al.*, 1998)

O maior destes surtos ocorreu na cidade de Sakai em 1996. Aproximadamente 7892 crianças e 74 professores foram afetados com três óbitos registrados entre as crianças. O alimento responsável foi o broto de rabanete branco produzido com técnica hidropônica. Não foi identificada a fonte de contaminação do

rabanete produzido em uma única fazenda. (WHO, 1997, MICHINO *et al.*, 1998 e PARK *et al.*, 1999)

A investigação epidemiológica de outros cinco surtos por *E. coli* O157:H7 no Japão em 1996 apontaram o rabanete branco e saladas como fontes de infecção. Pesquisas desenvolvidas nos EUA tem implicado alimentos de origem vegetal em 19% de 75 surtos entre 1982 e 1995. A alface em particular foi responsabilizada em 3 surtos em 1995. (MICHINO *et al.*, 1998)

Em 1997 um estudo no gado bovino foi positivo em 1,4 % de 4185 amostras fecais e 0,3% das carcaças para *E. coli* O157:H7. (WHO, 1997)

3.3.6 Austrália

Pesquisas em crianças com diarreia mostram uma pequena incidência por cepas STEC na Austrália. A incidência por O157:H7 é particularmente baixa quando comparada com a América do Norte e Reino Unido, embora também ocorra na Austrália. (ROBINS-BROWNE *et al.*, 1998)

Entre 1987 e 1994 foram investigados casos de SUH em hospitais. Entre os 12 casos de infecção por STEC, apenas três eram do sorogrupo O157 e destes apenas um do sorotipo O157:H7. Os outros dois eram cepas não moveis (O157:NM). Outros sorotipos STEC identificados foram: O6:H31, O26:H11, O91:H10, O98:H-, O111:H-, O111:H8 ,O112:H2 e O146:H8. Em outro estudo em hospital pediátrico em Sydney em 1989 foi confirmada a baixa frequência do sorogrupo O157 em crianças com diarreia. Apenas dois casos O157:NM foram identificados em 1843 casos estudados. (ROBINS-BROWNE *et al.*, 1998)

Apenas dois surtos foram notificados na Austrália. O primeiro no verão de 1995 causado pelo sorotipo O111:H- com 200 casos de colite hemorrágica, quatro casos de SUH em crianças e outros quatro casos de púrpura trombocitopênica trombótica (TTP). A cepa O111:H- isolada, produziu as toxinas STx1 e STx2, carregava o gene *eae* codificador da intimina e o plasmídeo codificador da enterohemolisina (pEHEC). O segundo surto com diarreia sanguinolenta em duas crianças e um adulto foi causada pelo sorotipo O157:H7. (WHO, 1997 e ROBINS-BROWNE *et al*, 1998)

TAMBUNAM e BENSINK (1997) citados por ROBINS-BROWNE *et al.*, (1998) pesquisaram animais em matadouro, encontrando genes *stx* em 34% dos animais estudados. Entre as ovelhas a prevalência foi maior (69%) entre 101 animais, do que em bovinos (18%) em 105 animais.

DESMACHELIER *et al.* (1997) citado por ROBINS-BROWNE *et al.*, (1998) pesquisaram animais de fazenda e em abatedouros. Usando PCR detectaram os genes *stx* em 31% de 576 animais, isolando cepas STEC de 9% destes. As maiores taxas de isolamento foram obtidas entre cordeiros e bezerros que em animais adultos, porém as cepas STEC isoladas dos cordeiros raramente carregavam o gene *eae* ou pEHEC. A maioria dos bezerros possuía ambos os fatores de virulência. usando IMS (separação imunomagnética) para detecção do sorogrupo O157, encontraram 10 casos (1,7%) em 576 amostras. Nove destes isolamentos eram do sorogrupo O157:H-. Com metodologia similar CHAPMAN *et al.* (1994) citados por ROBINS-BROWNE *et al.*, (1998) encontraram 84 casos (8,2%) de infecção por *E. coli* O157 em 1024 swabs retais em gado leiteiro no Reino Unido.

Suspeita-se que as cepas do sorogrupo O157 da Austrália sejam menos virulentas. As razões não são claras, mas a maior proporção das cepas O157 australianas produzem apenas STx1, o oposto de outros países onde geralmente as cepas produzem apenas STx2 ou ambas as toxinas. Além disso, mais de 50% das cepas australianas pertencem ao fagotipo 14 que corresponde a menos de 10% das cepas do Reino Unido, Canadá e Nova Zelândia podendo indicar que este subclone pode ser menos virulento que outros. (ROBINS-BROWNE *et al.*, 1998)

3.3.7 América do Sul

Entre os casos esporádicos de SUH, 75 a 100% estão associados com infecção por cepas STEC na Europa, América do Norte e principalmente na Argentina. Na Argentina a SUH é a causa mais comum de insuficiência renal aguda e crônica em crianças pequenas. A incidência de SUH na Argentina é 7 a 10 vezes maior que em outras áreas do mundo. (LOPEZ *et al.*, 1998)

O número estimado de casos de SUH por ano é de 300 a 400 em Buenos Aires e áreas suburbanas. Mais de 5500 casos foram notificados no período de 1965 a 1993. A incidência anual em crianças menores de quatro anos é aproximadamente de 22/100000 enquanto no Canadá é de três a 4/100000 , no Reino Unido de 4,2/100000 ,no Uruguai de 5/100000 e no condado de King no Estado de Washington (EUA) é de 3/100000. (WHO, 1997, LOPEZ *et al.*, 1998 e PARK *et al.*, 1999)

Entre 1987 e 1996 foram atendidos 897 casos de SUH em um hospital pediátrico de Buenos Aires com uma média de 50 casos por ano. A média de idade dos casos foi de $14,8 \pm 9,6$ meses com 47% dos casos ocorrendo em meninas. 87%

dos casos tinham histórico de diarreia sanguinolenta nos sete dias anteriores ao início do quadro de SUH. Em 57% dos casos foi necessária diálise peritoneal. Entre 0,3 e 6% dos casos apresentaram algum comprometimento neurológico como: hemiparesia, movimentos involuntários, atrofia ótica e retardo mental. Algum grau de insuficiência renal crônica ocorreu em 44% e a letalidade foi de 1,09%. (LOPEZ *et al.*, 1998)

LOPEZ *et al* (1998) conduziram estudo em crianças com SUH e crianças com diarreia comparadas com contatos familiares e crianças saudáveis como grupos controle. Entre as crianças com SUH, 57% tinham evidência de infecção por STEC, em pacientes com diarreia sanguinolenta 38,9%, e em crianças com diarreia aquosa 21%. *E. coli* O157:H7 foi isolada em apenas 3% dos casos de SUH e em 3% dos casos com diarreia. Os fatores de risco identificados associados com a SUH foram: infecção por STEC e diarreia sanguinolenta ($p=0,024$), febre durante o processo diarreico ($p<0,003$) e tratamento prévio com cotrinoxazole ($p=0,0025$). Os sorotipos STEC isolados nestes pacientes com SUH foram: O157:H7, O1:NM, O2:NM, O15:H(-), O21:H(?), O25:H(-) , O26:H(-), O49:H10, O75:NM, O92:H3, O103:H2 e O11:NM.

Uma possível explicação para esta situação epidemiológica é o consumo de carne bovina na Argentina, o maior do mundo, com 60 Kg/habitante/ano. A carne bovina é a proteína de origem animal mais barata no país. As crianças argentinas consomem carne bovina muito cedo, 20% aos 5 meses de idade e 80% delas comem carne três vezes por semana. Cerca de 80% da carne consumida no país é consumida sem tratamento térmico adequado. (LOPEZ *et al.*, 1998)

ORSKOV *et al.* (1987) citados por LOPEZ *et al.*, (1998) encontraram uma prevalência de 7,7% de *E. coli* O157:H7 em bezerros de 1 a 3 meses de idade em diferentes fazendas na Argentina.

Dados do Chile indicam que 9% dos casos de SUH estão associados com *E. coli* O157:H7, uma incidência menor que a observada nos EUA e Canadá, mas maior que a observada na Argentina para este sorotipo. Um estudo realizado em matadouro demonstrou que 34,5% das amostras fecais de bovinos em matadouro são portadoras de cepas STEC, inclusive o sorotipo O157. (PARK *et al.*, 1999)

Na Colômbia informes preliminares mostram que 7,2% das crianças com diarreia infecciosa tem *E. coli* O157:H7 e 6,5% dos bovinos adultos são portadores do sorotipo. (PARK *et al.*, 1999)

No Uruguai a incidência de SUH é de 5/100000 em crianças com menos de cinco anos e 48% desses casos estão associados com infecção por STEC. Não se isolou nenhum caso de *E. coli* O157 em pacientes com SUH no Uruguai até 1996. (LOPEZ *et al.*, 1998)

3.3.8 Brasil

No Brasil, o sistema de vigilância epidemiológica obriga a notificação de surtos de qualquer natureza, inclusive aqueles cujo agente etiológico são organismos veiculados por alimentos. Entretanto, casos esporádicos de doenças diarreicas não são de notificação compulsória, exceto cólera.

Os laboratórios de saúde pública apenas recentemente (2000) foram equipados para a pesquisa do sorotipo O157:H7 e apenas os laboratórios de referência estão capacitados para a pesquisa de outros sorotipos STEC. Essas

limitações, além da escassez de trabalhos realizados sobre o tema das STEC resultam em poucos dados disponíveis sobre a situação epidemiológica no Brasil.

GIRALDI *et al.* (1990), GUTH *et al.* (1994) e GOMES *et al.* (1991) citados por CERQUEIRA (2000) pesquisaram STEC em amostras de fezes de crianças com diarreia e detectaram freqüências de STEC menores que 1% em São Paulo, nenhum do sorotipo O157:H7. No estado do Rio de Janeiro, PRADO *et al.* (1997) citados por CERQUEIRA (2000) pesquisaram a freqüência do gene *stx* em 187 amostras de fezes em casos de diarreia e encontraram três amostras positivas. (CERQUEIRA, 2000)

YONO *et al* (1986) citados por CERQUEIRA (2000) pesquisaram amostras de *E. coli*, isoladas de bezerros com diarreia da região Centro - Oeste e 70% destas tiveram efeito citotóxico em células vero. COELHO *et al.* (1995) e SALVADOR *et al.* (1997) citados por CERQUEIRA (2000) pesquisaram a presença de STX em bezerros com diarreia na região de Campinas – SP e identificaram a presença da toxina em 32% e 19% das amostras respectivamente.

FRANCO *et al.*, (1991) citados por CERQUEIRA (2000) analisaram 306 amostras de vários alimentos em São Paulo e encontraram uma amostra positiva para STX. MARQUES e LANDGRAF (1998) citados por CERQUEIRA (2000) não detectaram nenhuma contaminação por STEC em 100 amostras de hambúrguer. SILVEIRA *et al.* (1999) pesquisaram 886 amostras de hambúrguer bovino de oito fábricas diferentes e não encontraram *E. coli* O157:H7.

CERQUEIRA *et al.*, (1997) encontraram 20% de amostras de alimentos produzidos com carne crua, positivas para STEC no município do Rio de Janeiro. GONZALEZ *et al.* (2000) citados por CERQUEIRA (2000) pesquisaram 190 cepas *E.*

coli isoladas de frangos no Rio de Janeiro encontrando duas cepas portadoras do gene *stx2* e em uma delas também do gene *eae*. SCHUCH (1997) pesquisou *Escherichia coli* O157:H7 em cecos e carcaças de frangos de corte no Rio Grande do Sul utilizando a técnica de separação imunomagnética. Em 126 amostras de cecos e 125 amostras de carcaças de frango, quatro cultivos de ceco e um de carcaça foram positivos para *Escherichia coli* O157:NM, porém nenhuma cepa mostrou capacidade verotoxigênica.

CERQUEIRA (2000) pesquisou a presença de STEC em bovinos e marcadores de virulência no Rio de Janeiro encontrando o gene *stx* em 71% das 197 amostras fecais, 82% entre os animais de aptidão leiteira e 53% entre os bovinos de corte com 58% das cepas STEC produtoras das toxinas STX1 e STX2 concomitantemente. Fez o isolamento de três amostras do sorotipo O157:H7 de três animais distintos pela primeira vez no Brasil.

Não existem trabalhos publicados referentes ao tema das STEC no Estado do Paraná.

3.4 Origem do Sorotipo O157:H7

Escherichia coli O157:H7 é considerada um novo patógeno emergente primeiramente identificado em um surto de colite hemorrágica em 1982 nos EUA. (TAUXE, 1997, WHITTAN, 1998 e CONTAMINACIÓN, 1996)

Doenças infecciosas emergentes são definidas por ROUQUAYROL, (1999) como: “Doenças que surgiram recentemente (últimas duas décadas) numa população, ou as que ameaçam expandir-se num futuro próximo”.

Após a identificação do agente, vários estudos foram realizados com amostras de *E. coli*. Nos EUA o C.D.C. sorotipou 3000 cepas estocadas desde o ano de 1973 e apenas um destes de 1975, isolado de uma mulher californiana com diarreia sanguinolenta foi do sorotipo O157:H7. No Reino Unido o laboratório de Saúde Pública encontrou apenas uma amostra O157:H7 entre 1500 isolamentos no período de 1978 a 1982. O laboratório de controle de doenças no Canadá encontrou o sorotipo em seis entre 2000 isolamentos feitos entre 1978 e 1982. (ARMSTRONG *et al.*, 1996 e COHEN, 1996)

Pesquisadores europeus desenvolveram estudo sorológico em pacientes com SUH. Pesquisando o antígeno O157 encontraram 14 positivos entre 33 pacientes no período de 1974 a 1981. (ARMSTRONG *et al.*, 1996)

Sabendo-se que a maioria dos casos de SUH na América do Norte são causados por *E. coli* O157:H7 (GRIFFIN *et al.* 1998), vários estudos retrospectivos foram desenvolvidos investigando a tendência da SUH. Em dois estudos retrospectivos foi detectado aumento de incidência para SUH, o primeiro referente ao período de 1979 a 1999 conduzido por MARTIN *et al.* (1990) citados por ARMSTRONG *et al.* (1996) em Minnesota (EUA) e outro no Estado de Washington (EUA) para o período de 1971 a 1986 conduzido por TARR *et al.* (1989) citados por ARMSTRONG *et al.* (1996). Outro estudo referente ao período de 1971 a 1990 em Utah (EUA) conduzido por SIEGLER *et al.* (1994) citados por ARMSTRONG *et al.* (1996) não detectou aumento de incidência.

Desde o primeiro surto de 1982, *E. coli* O157:H7 foi reconhecida como um novo patógeno. No início da década de 80 o número de surtos notificados era de seis. Em 1993 ocorreram 17 e em 1994 foram 30 episódios. Em termos de

reconhecimento e de impacto nas políticas de Saúde Pública, *E. coli* O157:H7 é claramente um patógeno emergente. Entretanto, não está provado que os grandes surtos de *E. coli* que ocorreram desde 1982 representem um novo fenômeno. O aumento do número de casos informados nesse período são em parte reflexo de uma melhoria na vigilância epidemiológica. Embora seja uma infecção emergente em termos de identificação do agente etiológico é improvável que venha a ser possível identificar o primeiro caso de O157:H7 ou como ocorreu sua difusão na população animal e humana. (ARMSTRONG *et al.*, 1996)

Não está claro, se trata-se de um novo patógeno em nível molecular, isto é, uma cepa que subitamente adquire genes que codificam fatores de virulência, resultando na ocorrência de uma doença totalmente nova onde os bovinos são um novo reservatório, ou um agente só recentemente reconhecido ou relatado. (ARMSTRONG *et al.*, 1996). A SUH reconhecida como síndrome clínica associada com infecções não foi descrita antes de 1955 o que sugere o surgimento de um agente etiológico relativamente novo. (COHEN, 1996)

Em relação ao reservatório bovino existe um único caso documentado de infecção por *E. coli* O157:H7 anterior a 1982, identificado como o sorotipo predominante de um entre 13 casos de colibacilose na Argentina em 1977 (ARMSTRONG, 1996).

Estudos com técnicas moleculares mostram que a evolução da *E. coli* O157:H7 provavelmente teve início a cinco milhões de anos quando esta e *E. coli* O55:H7 (um sorotipo de *E. coli* enteropatogênica) tinham um ancestral em comum. (LOUIE *et al.* (1994) citados por MENG e DOYLE (1998) desenvolveram um estudo

onde demonstraram que os genes *eae* da *E. coli* O157:H7 e O55:H7 são praticamente idênticos.

O sorotipo O157:H7 surgiu pela perda da habilidade para fermentar o sorbitol e para produzir β -d- glicuronidase. Durante sua evolução adquiriu fatores de virulência como a ilha de patogenicidade codificadora de fatores de aderência intestinal, um grande plasmídeo codificador de hemolisina, outros supostos fatores de virulência e genes de bacteriófagos codificadores de citotoxinas denominadas shigatoxinas (STX). Além disso um elemento crítico para a emergência deste patógeno foi a evolução da ácido resistência que permite a sua sobrevivência em alimentos ácidos e uma eficiente transmissão em baixas doses infectantes. Infelizmente não é possível com os dados disponíveis determinar quando o organismo adquiriu fatores de virulência suficientes para causar a síndrome urêmica hemolítica (SUH), nem pode-se determinar quando se adaptou em populações animais. (PARK *et al.*, 1999, ARMSTRONG *et al.*, 1999 e CERQUEIRA, 2000)

Os fagos codificadores das toxinas STX são vírus (fagos lambda) amplamente distribuídos na natureza. Além da *E. coli* O157:H7 muitas cepas de muitos outros sorotipos de *E. coli* produzem STX, sugerindo que estes bacteriófagos tem disseminado os genes *stx* nas populações de *E. coli* na natureza. Citotoxinas também tem sido encontradas em *Citrobacter freundii* e *Enterobacter cloacae* indicando que os genes *stx* podem se difundir entre diferentes espécies de bactérias. (WHITTAN, 1998)

Baseando-se nas informações disponíveis sugere-se que o ancestral imediato da O157:H7 foi uma cepa patogênica com propensão para a aquisição de novos fatores de virulência na natureza. Possivelmente uma cepa O55:H7 adquiriu por

transdução genes *stx* e também o Plasmídio EHEC. (WHITTAN, 1998 e SCHUCH, 1997).

Existe com frequência a idéia de que doenças emergentes ocorrem apenas em países em desenvolvimento onde as condições sanitárias e recursos médicos são limitados. *E. coli* O157:H7 serve como um exemplo de patógeno que aparece (ou é identificado) em um país do primeiro mundo com graves repercussões em Saúde Pública (ARMSTRONG *et al.*, 1996)

3.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

3.5.1 Toxinas

As shigatoxinas (STXs) formam uma família de citotoxinas bacterianas bioquímica, biológica e geneticamente similares produzidas por *Shigella dysenteriae* tipo 1 e STEC. São também conhecidas como shiga-like-toxins (SLTs) ou verotoxinas (VTs). STXs são citotoxinas para células vero (epitélio renal de macacos) e células hela (epitélio cervical humano). (PARK *et al.*, 1999, COHEN, 1996, MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998 e ACHESON *et al.*, 1998)

As STXs tem como estrutura básica o modelo 1A:5B (PEREIRA ,1999). A sub unidade "A" um polipeptídio de aproximadamente 32 KDa é composto por duas subunidades: A1 de 28 KDa corresponde à fração ativa e A2 de 4 KDa com função de ligação da sub unidade A às subunidades B e o pentâmero "B" de polipeptídios com cinco frações idênticas de 7,7 KDa responsável por dar aderência ao receptor Gb3 na célula eucariótica.(PARK *et al.*, 1999, CERQUEIRA, 2000, ACHESON *et al.*, 1998 e PARK *et al.*, 1999)

Uma cepa de *E. coli* produtora de toxina shiga pode produzir STX1 ou STX2 (ou uma variante como STX2c, STX2d ou STX2e) ou ambas as toxinas. A família das STXs pode ser dividida em dois subgrupos STX/STX1 e STX2. O primeiro subgrupo com STX produzida por *S.dysenteriae* tipo 1 e STX1 produzida por *E. coli* tem homologia genética com diferença de apenas um aminoácido entre as duas toxinas. A sequência de aminoácidos do subgrupo STX2 mostra apenas 55% de homologia com o subgrupo STX/STX1. (PARK *et al.*, 1999; COHEN, 1996, MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998 e CERQUEIRA, 2000)

A variabilidade do subgrupo STX2 localiza-se principalmente na subunidade “B” sendo maior na STX2e, que esta relacionada com a doença do edema do suíno. Todas as STXs aderem ao glicolipídio Gb3 (globotriosil - ceramida) embora STX2e ligue-se preferencialmente a Gb4 (globotetraosil - ceramida). (CERQUEIRA, 2000). Apesar de STX2e ser classicamente associada com a doença do edema em suínos, ocasionalmente cepas produtoras desta toxina são isoladas de casos de SUH e diarreia. (NATARO; KAPER, 1998)

O papel das STXs como principal fator de virulência das cepas O157:H7 foi confirmado por diversas evidencias:

- a) A SUH é causada unicamente por bactérias produtoras de STX, incluindo STEC e *Shigella dysenteriae* tipo 1;
- b) Cepas de *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) muito semelhantes a STEC em termos de virulência exceto pela produção de STXs não causam SUH;
- c) STX é altamente tóxica para células endoteliais renais in vitro, as mais atingidas em quadros de SUH;

d) Camundongos tratados com estreptomicina e posteriormente infectados via oral com STEC desenvolvem necrose tubular renal, um processo patológico que leva os animais a óbito;

e) Coelhos inoculados com cepas EPEC (amostra RDEC) na qual introduziram-se genes codificadores para STX através de um fago codificador de STX1 designado H19A desenvolvem sérias lesões histológicas, similares à Colite Hemorrágica causada por STEC;

f) Modelos animais em coelhos e suínos demonstraram que as células endoteliais são alvos de STX;

g) Cães da raça Greyhound inoculados intravenosamente com STX desenvolvem quadro de SUH similar ao observado em humanos com lesões vasculares nos glomérulos. (PARK *et al.*, 1999, CERQUEIRA, 2000 e MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998)

STX1 e STX2 além das variantes STX2c e STX2d são codificadas por fagos cujo DNA foi inserido no cromossomo bacteriano ou codificados no cromossomo (STX e STX2e). Uma única cepa STEC isoladamente pode produzir STX1, STX2 (ou uma variação desta) ou ambas as toxinas. (CERQUEIRA, 2000 e MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998). O fato de o gene codificador de STX ser encontrado em bacteriófagos temperados implica na possibilidade de transdução para outras cepas que podem se transformar em verotoxigênicas. (SCHUCH, 1997)

Outra diferença entre os subgrupos STX é que a produção de STX /Stx1, mas não STX2 é inibida por altos níveis de ferro. O único sinal ambiental específico que altera a síntese de STX2 é a temperatura e este efeito é considerado desprezível. (CERQUEIRA, 2000 e MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998)

O modelo aceito de como as toxinas shiga afetam as células sensíveis pode ser resumido da seguinte forma:

- a) O pentâmero B adere ao receptor Gb3;
- b) A toxina e o receptor são endocitados;
- c) O complexo toxina e receptor move-se para o aparelho de Golgi e retículo endoplasmático;
- d) A subunidade A11 interage com o componente 28S da subunidade 60S ribossomal clivando a adenina no que resulta a inibição da síntese protéica tendo como consequência a morte da célula.(ACHESON *et al.*, 1998, MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998 e CERQUEIRA, 2000)

Existem evidências epidemiológicas demonstrando que cepas de *E. coli* O157:H7 produtoras do subgrupo STX2 estão mais freqüentemente associadas com SUH que cepas O157:H7 que produzem apenas STX1. (PARK *et al.*, 1999 e MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998)

A LD50 para STX1 em inoculação intraperitonal em camundongos adultos CD-1 é de 400 mg, comparado com 1 mg para STX2. STX2 e não STX1 é a responsável pelas severas lesões necróticas nos túbulos renais e morte em camundongos alimentados com cepas STEC produtoras de ambas as toxinas. Esta diferença de toxicidade é também evidente quando células endoteliais renais humanas são tratadas com STX1 e STX2 purificadas. Nesse caso STX2 se mostrou 1000 vezes mais tóxica. (MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998, PARK *et al.*, 1999 e OBRIG, 1998)

Os diferentes tipos de STX apresentam variações quanto à atividade citotóxica em células vero, onde STX2 e STX1 são mais tóxicas que STX2c e

STX2d. Em estudos utilizando camundongos tratados com estreptomicina e inoculados intraperitonealmente a toxicidade obedece ao seguinte ordenamento(da maior para a menor): STX2d > STX2/STX2c > STX/STX1 > STX2e. (MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998)

A menor toxicidade da STX2e para camundongos pode refletir o fato de que STX2e utiliza Gb4 preferencialmente a Gb3 como receptor e ou que STX2e e STX2 tem uma diferença maior em aminoácidos que STX2 e suas outras variantes (STX2c e STX2d). (MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998)

Cepas *E. coli* O157:H7 freqüentemente elaboram STX1 e STX2, algumas produzem apenas STX2 e poucas produzem apenas STX1. Entre as cepas O157:H7 aproximadamente 85% produzem STX2 e menos de 30% produzem apenas STX1. (OBRIG, 1998)

3.5.2 Plasmídio pO157

Um fator de virulência comum às amostras STEC O157 e muito freqüente em amostras de outros sorotipos verotoxigênicos é um plasmídio de 90 Kb designado pO157. (SCHUCH, 1997, CERQUEIRA, 2000, PARK *et al.*, 1999, MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998 e KARCH *et al.*, 1998)

O fenótipo enterohemolítico típico de STEC caracteriza-se por hemólise observada após incubação a 37° C por 18 a 24 h em placas de ágar sangue contendo eritrócitos desfibrinados. O fenótipo enterohemolítico foi inicialmente identificado em amostras STEC O26 e codificado em fagos, com duas hemolisinas (Ehly1 e Ehly2). Em amostras STEC O157 este fenótipo é codificado pelo plasmídio pO157 e denominado hemolisina EHEC ou Ehly. Foi relatada uma íntima associação

entre a produção de enterohemolisina e a produção de STX em vários sorotipos STEC. (CERQUEIRA, 2000)

O gene codificador é *ehxA*. Ehly é uma toxina formadora de poros pertencente a família das toxinas RTX (“repeated in toxin”) devido a presença de seqüências genéticas repetidas características. (CERQUEIRA, 2000)

Imunoreações da hemolisina em soro de pacientes com SUH, demonstrando que a proteína é expressa no curso da infecção, sugerem que a proteína codificada por pO157 esta associada com a virulência da *E. coli* O157:H7 na patogênese da SUH, embora não comprovada. (PARK *et al.*, 1999 e KARCH *et al.*, 1998).

Cogita-se que a lise de eritrócitos in vivo possa contribuir para a multiplicação da bactéria, ao aumentar a disponibilidade de ferro. (NATARO; KAPER, 1998) *Escherichia coli* O157:H7 e outros sorotipos STEC apresentam um sistema especializado de transporte de ferro, permitindo à bactéria utilizar heme ou hemoglobina, liberados na lise de eritrócitos pela ação das hemolisinas. (NATARO; KAPER, 1998)

Além disso, como Ehly não efetua a sua ligação através de receptor específico, o espectro de células-alvo suscetíveis é amplo. (KARCH *et al.*, 1998)

Entre os produtos codificados pelo pO157, serina protease (EspP) pode ser um fator de virulência da bactéria uma vez que foi detectada uma resposta imune específica contra EspP em soros de pacientes com infecções por cepas STEC. (PATON; PATON, 1998)

A seqüência de aminoácidos de EspP é homóloga a muitas proteínas expostas na superfície de bactérias patogênicas, particularmente EspP da *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e as proteases IgA1 de *Neisseria spp* e *Haemophilus*

influenzae. EspP é capaz de clivar a pepsina A e o fator de coagulação V. Em pacientes com Colite Hemorrágica a degradação do fator V tem influência na cascata de coagulação prolongando a hemorragia. (PATON; PATON, 1998)

3.5.3 Região LEE

Os genes bacterianos envolvidos na histopatologia da lesão A/E foram demonstrados por MCDANIEL *et al.* (1995) que os localizou em uma região de 35 Kb no cromossomo da cepa EPEC E23489/69. Esta região denominada LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”) não está presente na flora normal de *E. coli* ou cepas enterotoxigênicas de *E. coli*, mas sim em cepas EPEC e STEC capazes de produzir a lesão A/E. Como é um grande bloco de DNA que codifica fatores de virulência múltiplos e não é encontrada em cepas não patogênicas foi denominada Ilha de Patogenicidade. (KAPER *et al.*, 1998a, 1998b, PARK *et al.*, 1999 e SCHUCH, 1997)

A formação da lesão A/E caracteriza-se pela destruição das microvilosidades das células epiteliais intestinais e uma aderência íntima entre a bactéria e a membrana epitelial da célula. Diretamente abaixo do local de aderência da bactéria são observadas alterações no citoesqueleto celular, incluindo a acumulação de filamentos de actina, formando uma estrutura similar a um cálice ou pedestal. (CERQUEIRA, 2000, SCHUCH, 1997 e KAPER *et al.*, 1998a)

A lesão A/E tem início com a aderência das bactérias e a formação de microcolônias localizadas sobre as células. Em EPEC este estágio depende da presença de um plasmídeo de 60 MDa. A expressão de antígenos fimbriais estaria associada a este plasmídeo. Entretanto, a aderência localizada não é sempre

observada em cepas STEC e não se comprovou a presença de nenhuma adesina relacionada a este fenótipo. (NATARO; KAPER, 1998, SCHUCH, 1997 e CERQUEIRA, 2000)

O locus LEE esta organizado com genes distribuídos em regiões com funções distintas. Os genes *esc* e *sep* codificam um sistema de secreção tipo III envolvido na secreção extracelular de diversas proteínas (EspA, EspB e EspD) codificadas por sua vez pelo gene *esp* também no locus LEE. Ocorrem ainda, o gene *eae* que codifica uma adesina denominada intimina e o gene *tir* que codifica o receptor para intimina que será translocado para a célula hospedeira. (PARK *et al.*, 1999, CERQUEIRA, 2000 e COHEN, 1996)

Após a adesão das cepas STEC às células epiteliais do intestino, eventos de transdução de sinais causam fosforilação de proteínas celulares do hospedeiro e aumento do nível intracelular de cálcio e de inositol-trifosfato , o que leva a eliminação (“effacement”) das microvilosidades. Como resultado da tirosina-desfosforilação de proteínas das células do hospedeiro, a intimina pode reorganizar os elementos citoesqueléticos, a actina filamentosa forma estrutura em forma de taça em pedestal abaixo da bactéria aderida (SCHUK, 1997). As proteínas EspS (EspA de 25 KDa, EspB de 38 KDa, EspD de 40 KDa) são responsáveis pelo início dos eventos de transdução de sinais com atuação mediadora na interação inicial de STEC com suas células alvo.(PATON; PATON, 1998 e KAPER *et al.*, 1998a)

Intimina é uma proteína da membrana externa bacteriana com 94 a 97 KDa que media uma aderência íntima da bactéria às células epiteliais. Em modelos utilizando suínos gnotobióticos observou-se que *E. coli* O157:H7 aderiu intimamente

nas células epiteliais intestinais destruindo as microvilosidades. (KAPER *et al.*, 1998a, TARR; BILGE, 1998, PARK *et al.*, 1999 e SCHUCH, 1997)

O papel da intimina foi provado em experimento no qual a aderência íntima nas células epiteliais desapareceu quando cepas EPEC sofreram mutação quanto ao gene *eae* codificador da intimina. (PARK *et al.*, 1999)

O principal receptor da intimina é uma proteína bacteriana que é translocada da bactéria para a célula hospedeira onde é fosforilada. Esta proteína denominada TIR (“translocated Intimin Receptor”) é codificada no locus *Lee* e é produzida na célula bacteriana como uma proteína não fosforilada de 78 KDa. Ao ser translocada para a célula hospedeira onde é fosforilada aumentando sua massa molecular para 90KDa, em cepas EPEC. Em STEC O157:H7 este processo não foi observado embora ocorra em STEC sorotipo O26:H11. Sabe-se que a intimina pode utilizar como receptor celular β -1 integrinas, mas com menor afinidade. (KAPER *et al.*, 1998a, 1998b e CERQUEIRA, 2000)

Embora a grande maioria das cepas STEC em doença humana possuam o gene *eae*, muitas cepas não-O157:H7 isoladas em casos humanos não apresentam o gene *eae* ou o plasmídio pO157, indicando que existem fatores de aderência adicionais ainda desconhecidos para a distinção de cepas patogênicas das não patogênicas. (KAPER *et al.*, 1998a, 1998b e CERQUEIRA, 2000)

3.6 Mecanismos de Patogenicidade e Manifestações Clínicas

Infecções por *E. coli* O157: H7 podem se caracterizar por:

- a) diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica que pode iniciar com diarreia sem sangue, e é a causa mais comum de diarreia hemorrágica na América do Norte;

- b) diarreia sem sangue, indistinguível de outras causas de diarreia;
 - c) Infecções assintomáticas com incidência desconhecida, com muitas pessoas com título de anticorpos anti SLTX e sem histórico de doença grave;
 - d) síndrome urêmica hemolítica caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiência renal aguda. Ocorre em 5 a 10% dos casos clínicos de infecção por *E. coli* O157: H7;
 - e) púrpura trombótica trombocitopênica com quadro clínico similar à síndrome urêmica hemolítica mas com complicações neurológicas mais frequentes.
- (COHEN, 1996, PARK *et al.*, 1999 e DUFFY *et al.*, 2000)

Na colite hemorrágica a diarreia sanguinolenta usualmente não tem início antes do terceiro dia. Em 89% dos pacientes a diarreia sanguinolenta ocorre a partir do 5º dia de doença. Um quadro similar ocorre em um terço ou metade dos pacientes com shigelose, uma condição em que a diarreia é inicialmente aquosa e a disenteria tem início após vários dias de doença. (COHEN, 1996)

A dose infectante das STEC é muito baixa (menos de 100 bactérias). A bactéria adere, mas não invade as células do epitélio intestinal. A STX causa lesão na sub-mucosa no endotélio dos capilares e resulta em colite hemorrágica. (ACHESON *et al.*, 1998 e MOMMENS *et al.*, 1998)

A aderência de organismos enteropatogênicos é um ponto crítico na patogenia da infecção. A aderência permite ao microrganismo resistir aos movimentos peristálticos intestinais, levando as toxinas elaboradas a um contato direto com as células intestinais. Provavelmente as lesões nas microvilosidades resultantes da aderência da bactéria, interferem com o transporte de fluídos e eletrólitos além da absorção de carboidratos. (COHEN, 1996)

Na colite hemorrágica o vômito ocorre em aproximadamente metade dos pacientes e a febre em um terço. Febre alta é indicativo de doença grave. A febre entre 38 e 38,9 °C indica doença moderada. A ausência de febre auxilia na distinção da doença em relação à shigelose onde a febre é um sinal importante. A combinação de dor abdominal severa e de diarreia hemorrágica é característica de infecção por STEC. (COHEN, 1996)

Exames por colonoscopia revelam uma distribuição não uniforme de lesões mucosas com o colo ascendente e transversal mais severamente afetados. Eritema e edema são as características mais significativas com hemorragia e ulcerações superficiais sendo também observadas. (COHEN, 1996) Stx produzida no intestino é presumivelmente a responsável pela necrose local e hemorragia observada em infecções por STEC. (DUFFY *et al.*, 2000)

O período de incubação da colite hemorrágica é de aproximadamente três a quatro dias, variando entre dois a oito dias. O período médio de duração da doença é de sete dias variando entre dois e 15 dias. (COHEN, 1996)

Em 1983, KARMALI *et al.* citados por COHEN (1996) reportam casos esporádicos de SUH associados com STEC e *Escherichia coli* O157: H7 foi o sorotipo mais frequentemente identificado. Toxinas shiga foram detectadas em amostras de muitos pacientes com SUH e estes apresentaram títulos sorológicos quadruplicados para anticorpos neutralizantes de toxinas shiga.

Evidências de infecção pré existentes com STEC tem sido observadas em 75 a 95% das crianças com SUH nas Américas do Norte e do Sul e na Europa. (MOMMENS *et al.*, 1998, COHEN, 1996 e DUFFY *et al.*, 2000). Vários estudos tem confirmado a predominância do sorotipo O157:H7 com SUH quando comparado com

outros sorotipos produtores de citotoxinas. (COHEN, 1996) Embora utilizando-se de métodos diferentes estudos de cultura direta e pesquisas de anticorpos sugerem que *E. coli* O157: H7 é responsável por 85 a 95% de todos os casos de SUH. (ROSE; CHANT, 1998) É possível que culturas negativas obtidas durante episódios de SUH não sejam positivas em decorrência da eliminação transitória do organismo pelos pacientes. (COHEN, 1996) A recuperação da *E. coli* O157: H7 é mais provável quando as amostras fecais para cultura são obtidas em até seis dias do início da diarreia. (COHEN, 1996) Desde que a SUH ocorre normalmente em seis a oito dias após o início do quadro diarreico (com variação de vários dias e semanas) o microrganismo pode não estar presente nas amostras fecais no momento do diagnóstico. (COHEN, 1996) Em casos esporádicos de colite hemorrágica a SUH ocorre em aproximadamente 10% dos pacientes. (MMWR, 2001) A proporção dos casos de colite hemorrágica que desenvolvem SUH varia conforme os diversos estudos. Em estudo prospectivo na Columbia Britânica, a SUH ocorreu em nove (36%) de 25 crianças com infecção por *E. coli* O157:H7. (COHEN, 1996) Em um surto em uma casa de repouso para idosos 24% dos infectados por *E. coli* O157:H7 desenvolveram SUH e mais da metade faleceram. Em duas instituições para deficientes mentais em Utah (EUA) oito casos (40%) de SUH ocorreram entre 20 infecções por *E. coli* O157 com 50% de letalidade. Por causa da severidade da doença e pela maior ocorrência em pacientes em idades extremas, casos de colite hemorrágica são freqüentemente hospitalizados. (COHEN, 1996)

Em surtos notificados nos EUA, 23% do total de pacientes são hospitalizados, 6% desenvolvem SUH ou PTT e 1% vão a óbito. Em um estudo realizado no Estado

de Washington, 42% dos pacientes com colite hemorrágica foram hospitalizados por 7,6 dias em média com 12 % desenvolvendo SUH ou PTT. (COHEN, 1996)

Em vários surtos, entre 17 a 30% dos indivíduos infectados não desenvolveram diarreia hemorrágica. (COHEN, 1996) Pacientes com diarreia aquosa são mais freqüentemente afebris e desenvolvem uma doença menos severa com menos tempo de duração que pacientes com diarreia sanguinolenta, sendo menos propensos a desenvolver SUH e PTT. A diarreia não sanguinolenta é mais freqüentemente associada com sorotipos STEC não-O157:H7. (MMWR, 2001))

Apesar de ser incomum o isolamento de *E. coli* O157:H7 em indivíduos assintomáticos, pesquisas em *pools* de imunoglobulinas humanas contém níveis significativos de anticorpos neutralizantes para STX₁. Anticorpos anti STX₁ ou STX₂ estão presentes em 14 a 20% dos controles em populações humanas.(COHEN, 1996

Os indivíduos assintomáticos em surtos possivelmente tenham desenvolvido infecção leve anterior não diagnosticada como STEC, desenvolvendo então uma infecção assintomática à nova exposição. (COHEN, 1996).

A mais importante complicação clínica das infecções por STEC é a síndrome urêmica hemolítica. A SUH é definida como um quadro de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiência renal aguda. Afeta mais freqüentemente crianças entre um e quatro anos de idade e pode resultar em doença renal ou neurológica crônica.(PARK et al., 1999 e COHEN, 1996).

A síndrome urêmica hemolítica foi primeiramente descrita em 1955, embora com etiologia desconhecida. A associação da SUH com a infecção por *Shigella Dysenteriae* tipo 1 foi estabelecida antes da identificação da *E. coli* O157:H7 como

enteropatígeno. (COHEN, 1996) Atualmente a associação da SUH e outras causas como : tumores malignos, uso de drogas, doenças congênitas e transplante de medula já foi descrita. (RAY *et al.*, 1998 e MOMMENS *et al.*, 1998).

A principal característica da SUH é a lesão das células endoteliais e a deposição de fibrina e plaquetas nos pequenos vasos (microangiopatia trombótica) renais (particularmente nos glomérulos). A oclusão dos capilares resulta em redução do fluxo sanguíneo e consequentemente insuficiência renal, podendo causar danos físicos aos eritrócitos. As lesões trombóticas são também observadas nos capilares intestinais, no cérebro e pâncreas. (PATON; PATON, 1998, OBRIG, 1998 e ACHESON *et al.*, 1998)

Cepas STEC produzem STX no lumem, que é absorvida pelo epitélio intestinal e translocada para a corrente sanguínea. A toxina liga-se aos receptores específicos das células alvo induzindo efeitos locais e sistêmicos. (PATON; PATON, 1998)

Estudos experimentais com administração intravenosa de STX₁ evidenciaram que a microangiopatia trombótica pode ser devida em parte a ação direta da STX nas células endoteliais correlacionada com a presença do receptor funcional para STX₁, Gb₃. A Ligação específica entre as STXs e o receptor glicolipídico GB₃ (Gal α 1-4- Gal β -4-Glucosylceramida) define a patologia das doenças induzidas por STXs. (MOMMENS *et al.*, 1998, ACHESON *et al.*, 1998 e PARK *et al.*, 1999)

De modo geral células endoteliais dos pequenos vasos são mais sensíveis às STXs do que os grandes vasos. Este fato é observado em capilares do colo, cérebro, pâncreas e pulmões nos pacientes com SUH. (OBRIG, 1998)

As bases exatas da extrema sensibilidade das células endoteliais renais humanas para as STXs não estão determinadas. Todavia, a quantidade ou qualidade dos receptores para STX podem ser determinantes. (PARK *et al.*, 1999 e OBRIG, 1998)

Anemia hemolítica com fragmentação de eritrócitos é característica na SUH. A fragmentação de eritrócitos parece ocorrer como resultado da passagem dos mesmos através dos vasos ocluídos por trombos intraluminais ricos em fibrina. (PARK *et al.*, 1999 e ROSE; CHANT, 1998)

No desenvolvimento da trombocitopenia, a agregação plaquetária é o mais importante fator, resultando no incremento do consumo de plaquetas. A trombocitopenia devida ao consumo de plaquetas pode ser agravada em pacientes com SUH e TTP pela ocorrência de um processo auto imune direto contra as plaquetas circulantes. Anticorpos antiplaquetários tem sido identificados em amostras de plasma de pacientes com SUH e TTP. (ROSE; CHANT, 1998) Além desses fatores existem evidências de que as STXs estimulam a agregação de plaquetas de maneira dose-dependente. (LINGWOOD *et al.*, 1998)

A razão pela qual a SUH é mais freqüente em crianças não é clara. Altos níveis de GB₃ foram identificados nos rins em humanos, particularmente na região cortical, o principal local de lesões renais em pacientes com SUH. Todavia, os maiores níveis de receptores são encontrados em adultos o que contrasta com a maior suscetibilidade de crianças para a SUH. Um estudo com STX₁ demonstrou que em adultos a toxina liga-se principalmente nos túbulos contornados distais, e em crianças nos glomérulos que é consistente com a maior suscetibilidade para SUH

em crianças. (PATON; PATON, 1998, MOMMENS *et al.*, 1998 e LINGWOOD *et al.*, 1998)

Muitos estudos sugerem que não apenas as STXs são responsáveis pela SUH devendo existir cofatores para a ocorrência da doença uma vez que:

- a) a resposta de células endoteliais é variável;
- b) os receptores para STX são encontrados em muitos tecidos, mas as lesões microangiopáticas da SUH só ocorrem nos rins;
- c) o número total de receptores para STX é grande em adultos mas estes não desenvolvem lesões renais;
- d) alguns locais de ligação da toxina são resistentes à toxina, enquanto outros são muito sensíveis;
- e) menos de 5% das crianças argentinas expostas a STX desenvolvem a SUH. (RAY *et al.*, 1998)

É conhecido o fato de que a sensibilidade das células endoteliais às STXs pode ser aumentada com a exposição ao antígeno LPS bacteriano lipossacarídeo (antígeno O) e citocinas do hospedeiro como TNF - α (fator alfa de necrose tumoral) e interleucina - 1β (IL - 1β). O aumento da sensibilidade provocada por estes agentes seria determinado pelo incremento da expressão do receptor Gb₃. (NATARO; KAPER, 1998 e OBRIG, 1998).

Uma vez que citocinas tem demonstrado capacidade de estimular a síntese de Gb₃ em uma variedade de células endoteliais, propõe-se que uma aberrante resposta às citocinas seguinte a produção de STX estimularia a síntese de GB₃ no endotélio renal podendo explicar o incremento de incidência da SUH em populações de idosos. (LINGWOOD *et al.*, 1998)

Embora todos os fatores de risco para o desenvolvimento da SUH não sejam conhecidos, aparentemente os extremos de idade são um importante fator. Em um estudo prospectivo, embora a taxa de incidência da SUH tenha sido de 10%, nos pacientes acima de 10 anos de idade com diarreia por *E. coli* O157:H7, apenas 4% desenvolveram SUH. (COHEN, 1996) A distribuição dos casos de SUH por idade pode ser consequência de deficiências imunológicas em crianças pequenas pela imaturidade do sistema imunológico e do declínio das funções imunológicas em idosos, embora diferenças na expressão do receptor Gb₃ possam contribuir. (PATON; PATON, 1998)

Outros fatores de risco são: diarreia hemorrágica, altas contagens de leucócitos, uso de drogas anti-diarreicas e antimotilidade e principalmente o tipo da toxina da cepa infectante. Indivíduos infectados com cepas produtoras de STX₂ tem maior risco de desenvolver SUH do que aqueles infectados com cepas produtoras de STX₁ ou de ambas as toxinas. (COHEN, 1996). A ocorrência de SUH após dois ou três dias do final da diarreia é improvável. (MMWR, 2001)

A letalidade por SUH aproxima-se de 5% e outros 5% apresentam seqüelas neurológicas e doenças renais graves. (PARK *et al.*, 1999, MMWR, 2001 e COHEN, 1996) Complicações neurológicas incluindo : apreensão, hemiparesia e alteração mental, ocorrem em um quarto dos pacientes. Aproximadamente a metade dos pacientes requer diálise renal e três quartos, transfusão de hemácias. A severidade do quadro de SUH está correlacionada com contagens elevadas de leucócitos, a presença de gastroenterite severa, idade abaixo de 2 anos e anúria no início do quadro clínico. (COHEN, 1996)

A púrpura trombótica trombocitopênica (PTT) apresenta todas as características da SUH, mas se diferencia desta pela ocorrência mais freqüente em adultos e por apresentar complicações neurológicas mais freqüentes com insuficiência renal menos freqüente. (COHEN, 1996 e PARK *et al.*, 1999)

A associação entre SUH e PTT foi observada em surto por *E. coli* O157:H7 no Estado de Washington (EUA). SUH e PTT mostraram-se relacionadas com uma única cepa de *E. coli* O157:H7 . (MMWR, 2001 e COHEN, 1996) A PTT tem normalmente evolução desfavorável para o paciente com desenvolvimento de trombose cerebral e 50% de letalidade. (MMWR, 2001 e PARK *et al.*, 1999)

Na SUH, microtrombos causam oclusão dos capilares, são ricos em fibrina e contém poucas plaquetas, enquanto na TTP os microtrombos contém pouca fibrina, são ricos em plaquetas e ocorre incremento do fator VIII de coagulação. Existe freqüentemente um infiltrado inflamatório de neutrófilos e monócitos na microangiopatia por SUH, que não são aparentes na PTT. A patogenia das duas condições é considerada distinta, a SUH é primariamente uma desordem do endotélio vascular, envolvendo danos as células com agregação plaquetária no local da lesão, enquanto na PTT a agregação plaquetária presente no plasma, acredita-se seja o evento inicial do processo. (ROSE; CHANT, 1998)

3.7 Reservatório

E. coli O157:H7 e demais sorotipos STEC são zoonoses com reservatórios naturais entre os ruminantes, principalmente os bovinos. Os demais sorotipos de *E. coli* enteropatogênicos são espécie – específicos. *E. coli* O157:H7 tem ampla

dispersão e esta presente em muitos rebanhos. (CERQUEIRA, 2000, COHEN, 1996, NATARO; KAPER, 1998 e PARK *et al.*, 1999)

As cepas STEC são tipicamente comensais em bovinos embora bezerros neonatos possam desenvolver diarreia e enterocolite. A prevalência de portadores entre os bovinos varia muito de local para local, mas a ocorrência de cepas STEC em fezes bovinas ocorre no mundo inteiro. Os dados resultantes dos diversos estudos normalmente não são comparáveis uma vez que distintos métodos são utilizados nos estudos de detecção. (DUFFY *et al.*, 2001)

A prevalência de STEC no gado de corte geralmente é menor que no gado leiteiro e isto se deve provavelmente a diferenças de manejo que é mais intensivo em bovinos de aptidão leiteira. (CERQUEIRA, 2000 e DUFFY *et al.*, 2001)

HANCOCK *et al.*, (1998) pesquisou o organismo em 36 propriedades leiteiras coletando 60 amostras fecais mensalmente em animais jovens. Durante seis meses de coleta, *E. coli* O157:H7 foi encontrada em 27 (75%) dos rebanhos. O mesmo autor pesquisando *E. coli* O157:H7 em 100 rebanhos de gado de corte em 13 Estados americanos em um único dia, encontrou o sorotipo em 63% dos rebanhos. FRETER (1992) citado por HANCOCK *et al.* (1998) estudando gado leiteiro informa que *E. coli* O157:H7 esta presente em todas as regiões dos EUA.

Prevalências regionais diferenciadas foram postuladas até recentemente para explicar as diferenças de incidência em humanos, maior no noroeste dos EUA comparado com o sul. Todavia estudos em rebanhos leiteiros não mostraram variações significativas de prevalência da *E. coli* O157:H7 entre as regiões. (ARMSTRONG *et al.*, 1996)

Em um determinado rebanho a eliminação fecal de *E. coli* O157:H7 esta restrita a um subgrupo de animais em um período de tempo limitado a dias ou semanas. Em um estudo de coorte com amostragens mensais em sete rebanhos, mais da metade das amostras positivas foram obtidas em uma única data de alta prevalência. Não foram detectados casos em 63% dos dias de coleta, embora *E. coli* O157:H7 tenha sido detectada anteriormente em todos os sete rebanhos. (HANCOCK *et al.*, 1998)

Em outro estudo prospectivo em 36 rebanhos com amostragem mensal durante seis meses a prevalência total (geral) de *E. coli* O157:H7 foi de 1,44% e o microrganismo foi encontrado em 27 rebanhos. Entretanto, 68,9% das datas de coleta não apresentaram nenhuma amostra positiva. Em contraste, em algumas destas datas, a prevalência foi maior que 10%, sendo a maior de 26,7%. (HANCOCK *et al.*, 1998)

A excreção fecal de *E. coli* O157:H7 é mais comum em épocas quentes. Em nove rebanhos amostrados mensalmente por um ano, a prevalência de junho a outubro foi maior que a observada de dezembro a março. (ARMSTRONG *et al.*, 1996 e HANCOCK *et al.*, 1998)

Os picos de prevalência em rebanhos nos EUA, ocorrem durante o período de abril a novembro. Este padrão é consistente com o observado em um rebanho leiteiro da Inglaterra por MECHIE *et al.* (1997), HANCOCK *et al.*, (1998).

O tempo de colonização do gado bovino por uma determinada cepa *E. coli* O157:H7 é tipicamente de dois meses ou menos (HANCOCK *et al.*, 1998). Portadores crônicos não tem sido identificados e a eliminação do agente não esta associada com doença reconhecível (GARBER *et al.*, 1995 e HANCOCK *et al.*, 1998).

SHERE *et al.* (1998) em um estudo longitudinal em quatro rebanhos leiteiros em Wisconsin (EUA) encontraram períodos de excreção variando entre uma e 16 semanas. O maior período de excreção observado em bezerros que em animais adultos é observado em *E. coli* genérica que é excretada mais freqüentemente e em maior número em bezerros comparativamente aos animais adultos. (ARMSTRONG *et al.*, 1996)

As diversas cepas de *E. coli* colonizam múltiplos indivíduos de um rebanho simultaneamente. Em varias espécies incluindo bovinos e humanos os animais jovens são mais facilmente colonizados por cepas *E. coli* e por isso a prevalência é maior nessa faixa etária. (HANCOCK *et al.*, 1998) A eliminação fecal de *E. coli* O157:H7 também é mais comum em animais jovens (2 a 24 meses) que em adultos. (DUFFY *et al.*, 2001 e DEAN-NYSTRON *et al.*, 1998) Bezerros também excretam cepas O157 por períodos maiores (ARMSTRONG *et al.*, 1996). Um dado importante em termos epidemiológicos é que os bovinos jovens também tem maior percentagem de cepas carreadoras de genes codificadores de toxinas shiga. (HANCOCK *et al.*, 1998)

A ecologia da *E. coli* O157:H7 é aparentemente idêntica a dezenas de outros sorotipos *E. coli* presentes em qualquer rebanho e pode ser recuperada em amostras fecais repetidas. (DUFFY *et al.*, 2001 e HANCOCK *et al.*, 1998)

Em estudo nos EUA, HANCOCK *et al.* (1998) pesquisou milhares de cepas *E. coli* isoladas de animais jovens e adultos em dois rebanhos leiteiros em que *E. coli* O157:H7 é endêmica. As cepas *E. coli* O157:H7 representaram menos de 1% do total das cepas.

A estabilidade da flora intestinal é alterada pelo uso de antibióticos (oxitetraciclina) e jejum por 24 a 48 h, quando se observa um incremento no número de biotipos *E. coli* presentes.(HANCOCK *et al.*, 1998)

Todos os estudos realizados para detectar a prevalência de *E. coli* O157:H7 em bovinos analisam amostras fecais. É possível que a principal localização do organismo nestes animais não seja o trato gastrointestinal distal, mas principalmente o rúmen. *E. coli* O157:H7 é ácido-tolerante podendo representar uma adaptação ao meio ácido do rúmen e o fato desse organismo ser muito encontrado em outros ruminantes como os ovinos reforça esta hipótese. Se este for o caso, amostras fecais são uma medida falha da prevalência nestes animais. (ARMSTRONG *et al.*, 1996) Por outro lado, apesar do sorotipo O157:H7 ser incomumente ácido-tolerante, é de fato menos tolerante que cepas isoladas originalmente do fluido ruminal. Este fato coloca em dúvida o papel do rúmen como principal localização do sorotipo no bovino. (ARMSTRONG *et al.*, 1998)

Resumidamente os diversos estudos epidemiológicos em bovinos tem demonstrado que:

- a) *E. coli* O157:H7 pode ser isolada de animais sadios e doentes com estimativas de prevalência na América do Norte e Europa com ampla variação conforme a área geográfica e o método de pesquisa utilizado;
- b) *E. coli* O157:H7 apresenta ampla distribuição geográfica nos EUA. Até 63% dos rebanhos pesquisados podem apresentar o sorotipo;
- c) *E. coli* O157:H7 é mais comum em bezerros do que em bovinos adultos. (PARK *et al.*, 1999 e ARMSTRONG *et al.*, 1996)

E. coli O157:H7 não é hospedeira específica de bovinos e não há evidências de que a ecologia deste agente seja diferente em alguma outra espécie. A ecologia do microrganismo em ovinos, aparentemente é similar a dos bovinos. *E. coli* O157:H7 esta amplamente distribuída na natureza e pode fazer parte transitoriamente da flora gastrointestinal de bovinos, ovinos, cervos, cães, eqüinos, pássaros, humanos e talvez outras espécies. (HANCOCK *et al.*, 1998)

No Reino Unido algumas pesquisas indicam que a prevalência de STEC em ovelhas é maior que no gado bovino. Existindo evidências de que cepas STEC são melhor adaptadas que outras *E. coli* para colonizar o trato gastrointestinal de ovinos. (DUFFY *et al.*, 2001) Embora ovinos apresentem uma alta prevalência de infecções por STEC, as cepas ovinas raramente possuem os genes *eae* que codificam a intimina, importante para o desenvolvimento da lesão “Attaching and Effacing” e tampouco o plasmídio pO157. Em contraste com o observado em bovinos, as cepas STEC de origem ovina, muito freqüentemente carregam os genes codificadores para STX₂d. (DUFFY *et al.*, 2001 e ROBINS-BROWNE *et al.*, 1998)

E. coli O157:H7 é um entre numerosos sorotipos de *E. coli* transitórias existentes em qualquer ecossistema. O número de cepas presentes em um rebanho bovino normalmente contém muitas cepas diferentes de *E. coli* O157:H7 e é objeto de mudança continua. (HANCOCK *et al.*, 1998)

O ambiente, particularmente a água e os alimentos tem um importante papel na ecologia da *E. coli* O157:H7 . A água em ambiente rural tem sido pesquisada ,com o isolamento freqüente do sorotipo. *E. coli* O157:H7 pode sobreviver em sedimento de coleções hídricas por mais de quatro meses , mesmo durante o inverno ,quando é raramente detectável em bovinos e aparentemente é capaz de

multiplicar-se nesse ambiente. A contagem total de *E. coli* em sedimentos aquáticos é significativamente maior no verão. *E. coli* O157:H7 pode multiplicar-se também em ração úmida como outros sorotipos de *E. coli*. (PARK *et al.*, 1999 e DUFFY *et al.*, 2001)

Cepas específicas de *E. coli* O157:H7 podem persistir em uma determinada área menos de dois anos. Transmissão entre rebanhos aparentemente ocorrem uma vez que cepas indistinguíveis são isoladas em áreas centenas de quilômetros distantes umas das outras. As cepas isoladas de outras espécies animais estão intimamente relacionadas ou são idênticas as cepas bovinas de determinada área geográfica. (HANCOCK *et al.*, 1998)

Embora novos sorotipos de *E. coli* possam ser introduzidos através da movimentação de bovinos e outras espécies entre os rebanhos, o alimento tem um papel chave na transmissão da bactéria, considerando que de um terço a mais da metade das rações comerciais contém *E. coli* em níveis detectáveis, além da habilidade de *E. coli* para multiplicar-se em alimentos que são ingeridos em grandes volumes diariamente. (HANCOCK *et al.*, 1998 e LYNN *et al.*, 1998)

A probabilidade de colonização dos bovinos por qualquer sorotipo *E. coli* depende da dose infectante e da suscetibilidade. A dose infectante é determinada pela replicação em alimentos e/ou água. A suscetibilidade para a infecção é influenciada pela idade e fatores como o jejum temporário que altera a flora gastrointestinal. (HANCOCK *et al.*, 1998)

Restrições alimentares e mudanças bruscas na dieta favorecem a eliminação de *E. coli* O157:H7 no gado bovino. Animais em jejum são mais suscetíveis a infecção por cepas O157 que animais bem alimentados. Em geral, restrições

alimentares, mudanças na dieta e administração de antibióticos afetam a microflora intestinal, incrementando o número de sorotipos de *E. coli* presentes. Mudanças na dieta também afetam as taxas de proliferação bacteriana no trato gastrointestinal, o que pode afetar o tempo de excreção. (ROBINS-BROWNE *et al.*, 1998 e DUFFY *et al.*, 2001)

Quando um ruminante se alimenta, as bactérias e protozoários do rúmen quebram os polissacarídeos complexos formando metano e dióxido de carbono que são eliminados, e os ácidos graxos voláteis que são absorvidos como fonte de carbono e de energia. A concentração de ácidos graxos voláteis e do PH do rumem (normalmente 5,0 – 7,5) depende da situação nutricional do animal. A concentração de ácidos graxos voláteis é maior e o PH do rúmen menor em animais bem alimentados e o inverso em animais em jejum. (ARMSTRONG *et al.*, 1996)

Os ácidos graxos voláteis inibem o crescimento de microrganismos entéricos. Acredita-se que a presença ou ausência de bactérias entéricas no rúmen esteja na dependência da situação nutricional do animal. (ARMSTRONG *et al.*, 1996)

Os animais levados a abate permanecem em jejum por um período de tempo variável, por não receberem alimentação durante o transporte visando facilitar as operações de evisceração no abatedouro. Um estudo na Tailândia mostrou que a prevalência de STEC é maior em matadouro (80%) do que em propriedades rurais (60%). (SUTHIENKUL *et al.* 1990 citados por ARMSTRONG *et al.*, 1996, ROBINS-BROWNE *et al.*, 1998 e DEAN-NYSTRON *et al.*, 1998)

RASMUSSEN *et al.* (1993) comprovaram que *Escherichia coli* O157:H7 foi inibida em meios que simulavam as condições normais do rúmen de animais bem nutridos, e foi capaz de crescer, sem restrições, em fluido ruminal coletado de

animais durante o período de jejum ante-mortem. Os resultados obtidos por estes pesquisadores alertam para o fato de que os trabalhos de avaliação de prevalência em rebanhos podem estar subestimados, quando comparados com as prevalências observadas em matadouros.

KUDUA *et al*, (1995) citados por ARMSTRONG *et al.*, (1996) estudaram o efeito da dieta na excreção de *E. coli* O157:H7 em ovelhas inoculadas. Dois tipos de dietas foram utilizadas no experimento. Um alimento concentrado em “pellets” de alfafa e um alimento rico em fibras. Os animais alimentados com alfafa eliminavam *E. coli* O157:H7 de forma intermitente. Estes mesmos animais alimentados com fibras, provocando a diminuição nos níveis de ácidos graxos, tiveram excreção aumentada de *E. coli* O157:H7.

Em um estudo realizado em 36 granjas leiteiras no noroeste dos EUA foi demonstrado que a alimentação com subprodutos de origem animal esta associada com alta prevalência do soro tipo O157:H7 em bovinos.(PARK *et al.*, 1999) As condições ácidas da silagem de milho podem favorecer a multiplicação da *E. coli* ácido-resistente , inclusive o sorotipo O157:H7. Foi demonstrado que bovinos alimentados predominantemente com grãos apresentam um baixo PH no cólon, favorecendo a sobrevivência e multiplicação de *E. coli* ácido-resistente, inclusive *E. coli* O157 :H7. (PARK *et al.*, 1999)

Ocorrem , todavia, fatos não esclarecidos . Logo após o nascimento , a anatomia e a dieta dos ruminantes determinam baixos níveis de fermentação com pequena produção de ácidos graxos voláteis no rúmen. Neste estágio “pré-ruminante” *E. coli* e outros organismos entéricos já são encontrados no fluido ruminal. Quando estes animais são desmamados a fermentação é aumentada e

também a produção de ácidos graxos voláteis, o que deveria diminuir a excreção de *E. coli* O157:H7. O que ocorre é exatamente o oposto , uma vez que diversos estudos apontam para uma maior prevalência em bezerros desmamados, mais especificamente ao final do período de desmame, quando comparados com bezerros na fase pré desmame. (ARMSTRONG *et al.*, 1996 e DUFFY *et al.*, 2001)

HANCOCK *et al.* (1994) conduziu dois estudos caso-controle, o primeiro no Estado de Washington e outro em propriedades rurais representativas dos EUA examinando a associação de práticas de manejo e prevalência da *E. coli* O157:H7. Um único fator de risco foi identificado : O uso de alimentação computadorizada, quando a alimentação dos animais é mais freqüente e regular. Não esta claro todavia, como este fator poderia influir na difusão da *E. coli* O157:H7 . GARBER *et al.* (1995) estudando apenas bezerros identificou o aumento da densidade dos animais na época do desmame como fator de risco para infecção por *E. coli* O157:H7. Existem outras evidências de que o aumento da densidade nos rebanhos aumenta a prevalência pelo sorotipo. As fazendas de engorda de gado diminuíram em número nos EUA nos últimos anos , de 121000 em 1970 para 43000 em 1988. Neste mesmo período o número de propriedades com mais de 16000 cabeças de gado aumentou , coincidindo com o surgimento dos primeiros casos de *E. coli* O157:H7 em humanos. (ARMSTRONG *et al.*, 1996) Esta situação muito comum em países do primeiro mundo decorrente da maior tecnificação dos meios de produção não é usual em países em desenvolvimento influenciando, talvez ,nas taxas de prevalência em populações humanas e animais. (PARK *et al.*, 1999)

3.8 Manifestações Clínicas em Animais

3.8.1 Bovinos

Infecções naturais e experimentais por STEC em bezerros são caracterizadas por colonização bacteriana do intestino, lesões A/E no colo e diarreia sanguinolenta (ARMSTRONG *et al.*, 1996 e DEAN-NYSTRON *et al.*, 1998).

Evidências epidemiológicas de infecções assintomáticas por *E. coli* O157:H7 em bovinos são bem conhecidas. Infecções experimentais com *E. coli* O157:H7 demonstram que estas cepas não são patogênicas para bovinos com mais de três semanas de vida. Após inoculação experimental com *E. coli* O157:H7, bovinos com mais de três semanas de vida podem excretar a bactéria até por mais de seis meses, mas, não desenvolvem lesões histológicas (DEAN-NYSTRON *et al.*, 1998).

E. coli O157:H7 é patogênica para animais muito jovens. Após inoculação com *E. coli* O157:H7, bezerros neonatos com menos de 36 h de vida desenvolvem diarreia e lesões A/E nos intestinos delgado e grosso. Estas lesões A/E consistem em áreas multifocais de degeneração epitelial com camadas de bactérias intimamente aderidas às células epiteliais (DEAN-NYSTRON *et al.*, 1998). Doença decorrente de infecções naturais por cepas STEC em bezerros estão bem documentadas. A doença ocorre tipicamente em animais com menos de uma semana de vida na forma de diarreia e diarreia hemorrágica sem evidências de efeitos sistêmicos da toxina. A maioria das cepas isoladas em animais sintomáticos produz STX1 como única toxina, porém STEC produtora de STX2 se mostrou capaz de produzir doença em estudos experimentais. Muitas cepas isoladas são positivas para o gene *eae* necessário para o desenvolvimento das lesões A/E no intestino. As lesões ocorrem no intestino delgado e grosso. Os sorotipos STEC mais

freqüentemente implicados na doença de bezerros são O5:NM, O26:H11, O26:NM e O111:NM (GYLES, 1998).

A cepa STEC O111:NM já foi identificada como causa de infecção em humanos (TARR; BILGE, 1998).

A severidade e a extensão das lesões A/E varia entre os bezerros. Após longa exposição à *E. coli* O157:H7, alguns bezerros exibem doença com hemorragia intestinal e infiltração de neutrófilos (DEAN-NYSTRON *et al.*, 1998).

A gravidade das lesões A/E aparentemente está relacionada com a idade do animal. A virulência da *E. coli* O157:H7 é maior em bezerros inoculados antes das 12h de vida em relação àqueles inoculados entre 30 e 36h de vida. *E. coli* O157:H7 não é patogênica para animais com mais de três semanas de vida. Este comportamento da O157:H7 é similar para outras cepas de *E. coli*, como *E. coli* enterotoxigênica em bovinos (DEAN-NYSTRON *et al.*, 1998).

Em bezerros desmamados (três a quatro meses de vida) mantidos em jejum de 48h, depois inoculados com *E. coli* O157:H7 e necropsiados quatro dias após a inoculação, as lesões A/E foram detectadas apenas em tecidos com contagens acima de 10^5 UFC/gr de tecido. O número e a extensão das lesões foram menores em animais mais velhos quando comparados com neonatos e todos esses animais mantiveram-se clinicamente sadios (DEAN-NYSTRON *et al.*, 1998).

Células endoteliais dos pequenos vasos dos glomérulos de bovinos são completamente refratárias para STX1 e STX2 in vitro na presença e ausência de LPS ou citocinas. Todavia, células endoteliais não glomerulares são sensíveis as STXs (OBRIG, 1998).

3.8.2. Cães

Casos de doença renal aguda com anúria precedida de gastroenterite hemorrágica tem sido identificada em cães (GYLES, 1998).

A doença é similar em muitos aspectos à SUH em humanos. Recentemente foi descrita uma vasculopatia glomerular e cutânea (“Alabama Rot”) em cães da raça greyhound. A lesão renal é similar a observada na SUH, mas com lesões cutâneas em que a necrose das arteriolas e isquemia da epiderme é evidente. Vasculopatia renal glomerular e cutânea foi associada com a cepa O157:H7 (GYLES, 1998, STROCKBINE *et al.*, 1998 e ARMSTRONG *et al.*, 1996).

3.8.3 Suínos

A doença do edema em suínos tem sido claramente associada a sorotipos STEC que produzem uma variante da toxina STX2 conhecida como STX2e. Diferentemente do observado em bezerros a doença do edema em suínos não se caracteriza por gastroenterite, mas por sinais de toxemia. A doença ocorre geralmente dentro de uma semana após o desmame e pode ocorrer como caso esporádico ou surtos. Também pode ocorrer na primeira semana de vida ou na fase adulta. Os sinais são: inapetência, edema de pálpebra, sinais neurológicos (ataxia, paralisia, convulsões) ou morte súbita sem sinais de doença. Na necropsia aparece edema de pálpebra, cabeça, parede do estômago, mesentério, linfonodos mesentéricos e cérebro. Hemorragia é observada algumas vezes nesses órgãos. Vários sorotipos estão implicados, principalmente O139:H1, O141:H4 e O138:H14 (PATON; PATON, 1998, DUFFY *et al.*, 2001 e GYLES, 1998).

A doença do edema em suínos e as seqüelas de infecções por STEC (SUH e PTT) compartilham características comuns, inclusive pródromos diarreicos, envolvimento do sistema nervoso central e danos em células endoteliais, sugerindo um mecanismo comum (COHEN, 1996).

Os estudos iniciais sugeriram um papel patogênico da STX2e exclusivo para suínos na doença do edema. Entretanto, informes sobre o isolamento de cepas produtoras de STX2e em humanos com doença diarreica e SUH sugerem que essas cepas podem estar envolvidas com doença humana (STROCKBINE, 1998).

3.8.4 Coelhos

Doença trombótica vascular similar à observada em humanos com SUH ocorre em coelhos inoculados com STX1. Todavia, a SUH não ocorre em coelhos, possivelmente porque estes não apresentam o receptor renal Gb3 para STX (COHEN, 1996).

3.9 Mecanismos de Transmissão

O consumo de alimentos de origem bovina crus ou mal passados são os meios mais comuns de transmissão da *E. coli* O157:H7. A contaminação com STEC durante o abate é a principal rota pela qual estes patógenos entram na cadeia alimentar e a contaminação fecal do couro ou vazamentos de matéria fecal de vísceras são as mais prováveis origens da contaminação (COHEN, 1996, PARK *et al.*, 1999, MENG; DOYLE, 1998 e BLANCO *et al.*, 1995)

No período de 1982- 1994, 22 surtos por *E. coli* O157:H7 foram associados a carne bovina moída nos EUA, representando 58% dos surtos notificados onde o veículo de transmissão foi identificado (MENG; DOYLE, 1998 e ARMSTRONG *et al.*, 1996). FROST *et al.* (1995) ao investigarem um surto envolvendo 20 casos de colite hemorrágica pelo sorotipo O157:H7 na Virgínia (EUA) identificaram o consumo de carne moída com tratamento térmico insuficiente como o único fator de risco para a doença (risco relativo = 6,3 ; IC = 3,1- 12,9).

O maior surto documentado por *E. coli* O157:H7 na América do Norte ocorreu nos Estados de Washington , Idaho, Califórnia e Nevada em 1993. Entre 732 casos, 195 foram hospitalizados, 55 desenvolveram SUH e quatro crianças foram a óbito. O alimento responsável foi hambúrguer de uma rede de lanchonetes. A investigação epidemiológica subsequente indicou que no procedimento de preparo de hambúrguer as temperaturas internas não atingiram 60° C, bem inferiores aos 68,3° C exigidos por determinação das autoridades sanitárias americanas (MENG; DOYLE, 1998 e COHEN, 1996).

Vários estudos demonstram que a contaminação da carne moída por cepas STEC é muito comum no Canadá (15 a 40%), EUA (23 a 25%), Reino Unido (17%) e Holanda (16,1%) (MENG; DOYLE, 1998).

Entretanto, o sorotipo O157:H7 é relativamente raro na carne bovina e subprodutos. Um estudo em grande escala, utilizando metodologia capaz de detectar 0,1 a 1.3 bactérias/gr, conduzido pelo USDAC (Departamento de Agricultura dos EUA) em 1995 revelou que a prevalência deste patógeno é pequena nestes produtos. No primeiro ano da pesquisa entre 500 amostras testadas, apenas cinco

foram positivas para *E. coli* O157:H7 (MENG; DOYLE, 1998 e ARMSTRONG *et al.*, 1996).

Muitos estudos de caso-controle em casos esporádicos foram conduzidos nos EUA e Canadá. O fator de risco mais importante em todas as pesquisas foi o consumo de carne moída bovina mal passada (BRYANT *et al.*, 1989, MAC DONALD *et al.*, 1988, ROWE *et al.*, 1993, LE SAUX *et al.*, 1993, MEAD *et al.*, 1995, RIES *et al.*, 1993; citados por ARMSTRONG *et al.*, 1996).

KASSENBERG *et al.*, (2000) conduziu estudo de caso-controle em cinco Estados americanos (Califórnia, Connecticut, Geórgia, Minnesota e Oregon) pesquisando 200 casos esporádicos de infecção *E. coli* O157:H7, concluiu como principal fator de risco o consumo de hambúrguer em restaurante (OR=7,2 ; IC= 2,4 – 21) e o consumo de hambúrguer fabricado em domicílio (OR=11,0 ; IC = 1,4 – 89).

Os estudos epidemiológicos em surtos por *E. coli* O157:H7 tem falhado sistematicamente em identificar os rebanhos de origem dos animais infectados. Os métodos modernos de fabricação de produtos cárneos como o hambúrguer utilizam a carne de dezenas ou centenas de animais diferentes e de diversas origens. O grande surto de 1993 nos EUA teve como origem, hambúrguer produzido com carne de animais provenientes dos EUA, Canadá e Nova Zelândia. A carne com origem nos EUA provinha por sua vez de 443 animais de seis Estados e cinco matadouros distintos (ARMSTRONG *et al.*, 1996).

Em termos hipotéticos, uma única carcaça contaminada com *E. coli* O157:H7 pesando 300 Kg pode contaminar oito toneladas de carne moída utilizada como matéria prima na fabricação de hambúrguer (ARMSTRONG *et al.*, 1996). O processo de lavagem das carcaças pode dispersar contaminantes na superfície da carcaça e

favorecer a contaminação cruzada para outras carcaças. O contato direto das carcaças na linha de abate e o manipulador de alimentos são outros prováveis meios de contaminação. (DUFFY *et al.*, 2001 e SMITH *et al.*, 1998) Nessas carcaças, por sua vez, a contaminação da superfície será transferida para o interior da massa de carne proveniente de muitas carcaças durante o processo de moagem. (DUFFY *et al.*, 2001 e COHEN, 1996) Como resultado do aumento do volume de produção aumenta o risco de grandes surtos, ao contrario do passado quando um único animal infectado gerava surto de extensão mais ou menos limitada. (ARMSTRONG *et al.*, 1996)

A identificação de carcaças contaminadas por matéria fecal pode ser realizada através da pesquisa de *E. coli* genérica que entre os gêneros de coliformes fecais é mais facilmente diferenciada das bactérias não fecais. Todos os demais grupos tem associação duvidosa com a contaminação fecal. *E. coli* embora também possa contaminar carcaças a partir de fontes não fecais é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento. SILVA *et al.*, (1997)

Os hábitos dos consumidores podem ter influencia na ocorrência de surtos por *E. coli* O157:H7. A carne moída, diferentemente de muitas outras carnes cruas consumidas em peças inteiras em que os contaminantes concentram-se normalmente na superfície, apresenta microrganismos localizados no interior do produto como consequência do processo de fabricação. Quando o hambúrguer é consumido mal passado, como é habito de 23 a 25% da população norte americana, a carne no interior do hambúrguer contém organismos viáveis. Uma vez que a dose infectante de *E. coli* O157:H7 é muito baixa, um pequeno número de bactérias são suficientes para resultar em infecção. No grande surto de 1993, nos EUA, o

hambúrguer estava contaminado com 700 células bacterianas no alimento cru, número que deve ter diminuído bastante após o tratamento térmico (DUFFY *et al.*, 2001, COHEN, 1996 e ARMSTRONG *et al.*, 1996).

Escherichia coli O157:H7 é isolada principalmente nos meses quentes do ano. No estado de Washington os estudos prospectivos apresentam um pico de incidência entre junho e setembro com 60% dos casos (COHEN, 1996). Os fatores responsáveis por este comportamento sazonal estão ligados a ecologia do microrganismo nos bovinos e aos hábitos de consumo de carne bovina moída. Embora os surtos ligados a restaurantes tenham recebido mais atenção, o maior número de casos provavelmente resulte do tratamento térmico inadequado da carne moída no domicílio. O maior consumo de carne moída na América do Norte ocorre em refeições ao ar livre nos meses de verão (COHEN, 1996).

Além da carne bovina moída, muitos outros alimentos já foram identificados como veículo de transmissão para *E. coli* O157:H7 como: roast beef, charque, salame, leite cru, iogurte, alface, suco de rabanete e broto de alfafa. DOYLE e SCHOENI (1987) citados por MENG e DOYLE, (1998) isolaram *E. coli* O157:H7 de seis (3,7%) entre 164 amostras de carne bovina, quatro (1,5%) entre 264 amostras de carne suína, quatro (1,5%) entre 263 amostras de frangos, e quatro (2%) entre 200 amostras de carne de cordeiro em Alberta, Canadá. Usando provas para detecção de genes *stx*, SAMADPOUR *et al.* (1994) citados por MENG e DOYLE, (1998) identificaram cepas STEC em 18% das amostras de carne suína, 12% em frangos, 7% em peru, 10 % em peixe e 5% em ostras.

Em maio de 1996, um surto envolvendo 47 casos em Illinois e Connecticut (EUA) apontou a alface como veículo de transmissão. A investigação epidemiológica

indicou como provável causa do surto, a contaminação da verdura com fezes bovinas na fazenda de origem (MENG; DOYLE, 1998). Um surto no Reino Unido foi atribuído ao consumo de batatas cultivadas em um campo contaminado com esterco bovino (ARMSTRONG *et al.*, 1996).

Em 1996 um grande surto em vários Estados americanos com 71 casos confirmados e um óbito teve como veículo de transmissão o suco de maçã. Suspeita-se que maçãs caídas no solo foram contaminadas com adubo a base de esterco bovino. (MENG; DOYLE, 1998, COHEN, 1996 e ARMSTRONG *et al.*, 1996) A observação de que *E. coli* O157:H7 pode sobreviver em PH ácido do suco de frutas pode explicar a pequena dose infectante da bactéria. Diferentemente de muitos enteropatógenos que não sobrevivem ao PH do estômago, quando um pequeno número destes organismos é ingerido, podem sobreviver, colonizar o intestino e provocar doença (COHEN, 1996).

E. coli O157:H7 foi isolada em salame curado, três meses após a ocorrência de um surto através deste alimento. Baseado no número de células O157:H7 encontradas no produto os investigadores estimaram a dose infectante entre duas e 45 bactérias (ARMSTRONG *et al.*, 1996).

Charque preparado com carne de cervídeos foi implicada como veículo de *E. coli* O157:H7 em um surto em 1995 (PARK *et al.*, 1999).

Os vegetais podem ser contaminados com STEC durante o cultivo como resultado do uso de esterco para fertilização e água contaminada para irrigação. *E. coli* O157:H7 foi inclusive capaz de se multiplicar em condições de cultivo por hidroponia no Japão em um grande surto por brotos de rabanete (DUFFY *et al.*, 2001).

Um surto de colite hemorrágica ocorrido em Ontário no Canadá teve como veículo de transmissão o leite cru e atingiu crianças de uma escola em visita a uma propriedade rural. COHEN, (1996) e PADHYE *et al.* (1991) citados por ARMSTRONG *et al.*, (1996) utilizando método sensível para pesquisa de *E. coli* O157:H7 em leite cru encontraram 10 % de positividade entre 115 amostras de leite de 115 fazendas leiteiras.

Transmissão com origem em água de bebida tem sido identificada. A infecção por *E. coli* O157:H7 através da água não clorada de abastecimento municipal (Missouri, 1989) foi confirmada em um grande surto (243 casos, 4 óbitos), e vários surtos recentes foram associados com a pratica da natação e outras atividade recreativas em lagos contaminados (PARK *et al.*, 1999, COHEN, 1996 e ARMSTRONG *et al.*, 1996).

WARNER *et al.*, (1995) ao investigarem um surto de colite hemorrágica por *E. coli* O157:H7 em Illinóis (EUA) conduziram um estudo caso-controle onde o fator de risco definido foi a ingestão acidental de água de um lago (OR = 12,4; IC= 1,3 – 118,3) onde se praticava natação. O departamento de saúde do condado de Washington em Nova York ao investigar outro surto envolvendo 116 casos confirmados identificaram a água de bebida utilizada no preparo de bebidas não alcoólicas como principal fator de risco associado com a doença (OR = 23,3 ; IC = 6,3 – 86,9). (MMWR, 1999)

Água de bebida provavelmente contaminada com fezes de bovinos esta implicada também em surtos na Escócia, África do Sul (20000 casos em 1992) e recentemente no Canadá (2000 casos no ano de 2000) e Japão (DUFFY *et al.*, 2001 e ARMSTRONG *et al.*, 1996).

Existem fortes evidências sugerindo a transmissão pessoa a pessoa em surtos em creches e casas de repouso. Em um grande surto de 1993 com 501 casos, aproximadamente 11% (48) dos casos resultaram da transmissão pessoa a pessoa. (COHEN, 1996 e ARMSTRONG *et al.*, 1996) A presença de casos secundários em 5% dos contatos familiares é sugestiva para disseminação pessoa a pessoa. Em um estudo em creches de Minnesota (EUA) foram identificados 68 casos em três creches e seis residências. Este estudo demonstrou a importância da transmissão pessoa a pessoa, especialmente em crianças. Em decorrência da pequena dose infectante, as técnicas de higiene pessoal podem não ser efetivas para evitar a transmissão nessas circunstâncias. (COHEN, 1996)

Em casos esporádicos de infecção por *E. coli* O157:H7 existem evidências da transmissão direta através de bovinos. Dois casos em crianças pequenas, no Canadá e na Escócia sugerem que a transmissão direta pode ocorrer embora seja rara (PARK *et al.*, 1999 e ARMSTRONG *et al.*, 1996). Recentemente CAGE *et al.* (2000) ao investigarem surto de infecção por *E. coli* O157:H7 entre crianças em idade escolar durante uma visita a duas fazendas na Pensilvânia e Washington (EUA) conduziram um estudo de caso- controle em que o fator de risco foi o contato direto com os bovinos (OR = 10,9 ; IC = 1,7- 70,7) seguido do ato de roer unha (OR= 2,5 ; IC = 1,1- 5,7) e como fator de proteção foi identificado o ato de lavar as mãos antes de se alimentar durante o tempo de permanência nas fazendas (OR = 0,2 ; IC = 0,1 – 0,7).

Estudos soro-epidemiológicos mostram que a incidência de elevados níveis de anticorpos anti-O157 LPS é três vezes maior em famílias que vivem em fazendas de gado leiteiro (12,5%) do que em famílias de áreas urbanas (4,7%) e a prevalência

de elevados níveis de anticorpos anti-STX1 é seis vezes maior em habitantes da área rural (42%) do que os de área urbana (7,7%) (NATARO; KAPER, 1998).

Sugere-se a possibilidade de que a contínua exposição de pessoas da área rural aos organismos estaria ligada a infecções sub-clínicas que funcionariam como imunização natural contra a doença (NATARO; KAPER, 1998).

3.10 STEC NÃO – O157

Já são conhecidos mais de 100 diferentes sorotipos STEC não-O157 associados com doença em humanos. Conforme a área geográfica considerada, de 20 a 70% dos pacientes são infectados por cepas não-O157 (WHO, 1998).

A incidência real de casos de doenças por STEC não-O157 é difícil de estimar porque as técnicas usadas na maioria dos laboratórios não são capazes de identificar esses microrganismos (COHEN, 1996).

Em geral, não se faz pesquisa de STEC não-O157 no mundo. Isto se deve ao fato de que muitas destas cepas não apresentam as mesmas características fenotípicas do sorotipo O157:H7 como a não fermentação do sorbitol em 24h e atividade hemolítica no ágar enterohemolisina, não podendo ser identificados em exames de rotina por SMAC. Em consequência a prevalência de infecções por cepas não-O157 é desconhecida (NATARO; KAPER, 1998 e WHO, 1998). O quadro clínico das infecções por cepas não-O157 é aparentemente similar às infecções por O157:H7 embora alguns autores informem que infecções por cepas não-O157 provocam diarreia sanguinolenta menos freqüentemente que o sorotipo O157:H7 (COHEN, 1996 e WHO, 1998).

Os métodos para pesquisa de cepas STEC não – O157 são os testes de citotoxicidade em culturas de células, testes imunológicos para detectar STX e métodos de pesquisa de DNA para genes produtores de STX (WHO, 1998 e MONTENEGRO *et al.*,1990)

Em vários estudos para identificação de organismos não – O157, a taxa de isolamento é dez vezes maior que a prevalência de O157. Entre os mais de 200 sorotipos não – O157, alguns como O26, O103, O111 e O145 são mais comumente isolados e são claramente reconhecidos como patógenos para humanos. No entanto em contraste com as cepas O157:H7, cepas STEC não – O157 podem ser isoladas de controles humanos saudáveis (COHEN, 1996). Dados de pesquisadores australianos sugerem que o sorogrupo O111 tem dose infectante comparável com o das cepas O157. Não existem dados sobre a dose infectante para outras STEC não – O157 (WHO, 1998).

A epidemiologia de infecções por STEC não-O157 é similar a de *E. coli* O157:H7. STEC não-O157 é mais frequentemente isolada de reservatórios animais e alimentos que cepas O157 (COHEN, 1996). Os estudos em animais reservatório são relativamente poucos para as cepas não – O157. Os dados publicados são de difícil comparação devido aos diferentes métodos de pesquisa empregados, mas prevalências acima de 21% em bovinos adultos e acima de 50% em bezerros tem sido detectadas (WHO, 1998). As estimativas da taxa de animais portadores para STEC não-O157 no gado bovino variam também conforme a área geográfica considerada (COHEN, 1996). WILSON *et al.*, (1992) estudando rebanhos leiteiros no Canadá encontraram prevalências de até 60% entre as vacas e de até 100% entre bezerros para cepas STEC não-O157.

Os alimentos são reconhecidos como o mais importante veículo de transmissão para cepas O157:H7 e provavelmente o mesmo ocorre com as cepas não-O157 que são isoladas em mais de 25 % das amostras de alimentos (WHO, 1998). Alguns estudos isolaram cepas STEC não-O157 em mais de 10% das amostras de carne moída (COHEN, 1996).

Esta alta taxa de isolamento de STEC não-O157 em animais reservatório e alimentos é de duvidosa significância epidemiológica. Alguns estudos mostram a presença destas cepas em mais de 60% das amostras de carne vendidas em açougue o que deveria gerar enormes epidemias se todas essas cepas fossem patogênicas. Outros fatores de virulência como a capacidade de provocar lesões A/E e a presença do plasmídio pO157 que expressa a hemolisina EHEC podem distinguir cepas patogênicas das não patogênicas. Por outro lado, muitas cepas não - O157 isoladas, claramente associadas com surtos ou casos esporádicos de doença em humanos não possuem o gene *eae* ou o plasmídio pO157, indicando que existem fatores de virulência desconhecidos para a distinção entre cepas patogênicas e não patogênicas entre os sorotipos não-O157 (COHEN, 1996 e NATARO; KAPER, 1998).

Aparentemente a ecologia das cepas não-O157 em animais e no ambiente é similar a O157:H7. Cepas não – O157 são isoladas de animais sadios e um animal individualmente pode carrear mais de um sorotipo, incluindo o sorotipo O157:H7 e vários sorotipos não-O157 ao mesmo tempo (WHO, 1998).

Ovinos e caprinos tem sido identificados como portadores, e suínos e aves não parecem ser reservatórios importantes para estes sorotipos. A excreção pelos bovinos é intermitente e devido a esta característica e a dificuldade para o

isolamento de cepas não-O157, a verdadeira prevalência de STEC no gado bovino e outras espécies é provavelmente maior do que os estudos sugerem (WHO, 1998).

Cepas STEC não-O157 podem provocar doença em animais, como diarreia em bezerros e doença do edema em suínos. Um pequeno número de sorotipos provoca doença em animais e também estão associados com doença em humanos. Cepas STEC O5: H-, O26:H11, O103:H2 , O111:H- e O145:H- causam doenças em bovinos e humanos (WHO, 1998).

3.11 Sobrevivência nos Alimentos e Ambiente

Os alimentos representam a principal fonte de infecção para STEC. A pequena dose infectante para *E. coli* O157:H7 significa que qualquer sobrevivência do patógeno no alimento representa risco de doença. A ocorrência do sorotipo em alimentos ácidos como suco de maçã demonstram que a cepa O157:H7 tem grande resistência a fatores ambientais (DUFFY *et al.*, 2001 e MENG; DOYLE, 1998).

E. coli O157:H7 e algumas outras STEC podem sobreviver e/ou multiplicar-se em uma variedade de alimentos, alguns considerados seguros para patógenos bacterianos. Temperatura de armazenamento, PH, conteúdo de sal e atividade de água são os fatores de maior importância que afetam a sobrevivência e o crescimento do organismo em alimentos (MENG; DOYLE, 1998).

Cepas STEC crescem entre 10 e 45°C embora *E. coli* O157:H7 cresça pouco em temperatura de 44 a 45°C, sendo termolábil (PARK *et al.*, 1999 e MENG; DOYLE, 1998). O valor “D” para 65°C em carne moída foi calculado em 0,39 minutos.(JUNEJA *et al.*,1997) O valor “D” aumenta com o incremento da

percentagem de gordura em carne moída. A fase de crescimento bacteriano do sorotipo O157:H7 tem influência na resistência ao calor. Na fase estacionária as células são mais resistentes ao calor do que na log fase (KAUR *et al.*, 1998 e PARK *et al.*, 1999). Estudo recente do efeito da temperatura de crescimento mostra que a recuperação de *E. coli* O157:H7 é mais fácil quando incubada a 42°C em carne moída (MENG; DOYLE, 1998).

Ao contrário da sensibilidade ao calor, *E. coli* O157:H7 sobrevive bem em carne moída durante a estocagem em baixas temperaturas (PARK *et al.*, 1999). Em carne moída estocada em freezer, não há alteração significativa da população microbiana quando estocada a -20°C por nove meses (MENG; DOYLE, 1998).

Uma característica fisiológica importante da *E. coli* O157:H7 com papel chave na transmissão é a tolerância do microrganismo em meios ácidos (DUFFY *et al.*, 2001 e MENG; DOYLE, 1998). As condições ácidas de alguns alimentos e suco gástrico são uma barreira para a penetração de patógenos ácido-sensíveis no organismo, enquanto a ácido-tolerância do sorotipo O157:H7, potencializa a sobrevivência nos alimentos ácidos e suco gástrico. Enquanto um agente enteropatogênico ácido-sensível necessita de um número alto de células para sobreviver e colonizar o trato gastrointestinal, um agente etiológico ácido-resistente como *E. coli* O157:H7 pode colonizar o trato gastro-entérico com uma pequena população. Este fato explica em parte porque a dose infectante do sorotipo é bastante pequena (PARK *et al.*, 1999).

A ácido-tolerância é uma característica geral de várias enterobactérias como *E. coli* e *Shigella* spp. A ácido tolerância destas bactérias, inclusive do sorotipo O157:H7, é dependente da fase de crescimento bacteriano (PARK *et al.*, 1999).

Muitas cepas STEC são capazes de sobreviver em PH menor que 2,5 por mais de 2h. *E. coli* O157:H7 na fase estacionária é mais resistente a exposição aos ácidos do que na fase de crescimento exponencial e não necessita de exposição prévia a baixo PH para exibir ácido resistência (MENG e DOYLE, 1998), dependente do gene *rpos* (PARK *et al.*, 1999). Em pesquisa para determinação da ácido resistência, *E. coli* O157:H7 na fase estacionária se mostrou resistente ao suco gástrico (pH=1,5) por mais de 3 h, um período que excede o tempo de trânsito médio dos alimentos no estômago (PARK *et al.*, 1999).

Sugere-se a hipótese de que o ambiente gastrointestinal dos bovinos induz a ácido resistência da *E. coli* O157:H7 . O organismo conservaria a ácido resistência nos alimentos mesmo após longo tempo de refrigeração podendo sobreviver no ambiente gástrico humano (PARK *et al.*, 1999).

Uma população de 10^5 UFC/ ml de *E. coli* O157:H7 foi inoculada em suco de maçã (PH 3,6 a 4,0) permanecendo estável por 12 dias a 8°C. *E. coli* O157:H7 sobreviveu a fermentação, dessecação e estocagem em salsicha fermentada (PH 4,5) por mais de dois meses a 4°C . Em leite inoculado com 10^3 a 10^7 UFC/ml de *E. coli* O157:H7, o organismo sobreviveu ao processo de fermentação para obtenção de iogurte a 42°C por 5h seguido de armazenamento a 40°C por uma semana . Estudos com o sorotipo O157:H7 em queijo cheddar revelam que pode sobreviver por mais de 60 dias de cura com PH variando entre 4.95 e 5,2 (MENG; DOYLE, 1998).

E. coli O157:H7 pode crescer bem em uma variedade de outros alimentos. O organismo cresce muito mais lentamente em leite não pasteurizado do que em leite

pasteurizado e o conteúdo de gordura não tem efeito na sobrevivência ou crescimento neste meio (MENG; DOYLE, 1998).

E. coli O157:H7 não apresenta resistência incomum ao sal. O agente não pode crescer em meio tripticase de soja (TSB) contendo mais de 6,5% de NaCl (MENG; DOYLE, 1998 e PARK *et al.*, 1999). Entretanto, o sorotipo O157:H7 apresenta uma tolerância incomum à dessecação. Em 1994 um surto de colite hemorrágica incriminou salame curado e dessecado como fonte de infecção (PARK *et al.*, 1999).

Um experimento com salame com PH = 4,56 a 4,63 e aw de 0,95 e 0,90 respectivamente demonstrou que o patógeno com 10^4 e 10^5 UFC/g sobreviveu à armazenagem em 5°C por 32 dias. *E. coli* O157:H7 isolada do grande surto da cidade de Sakai (Japão) em 1996 mostrou grande resistência à dessecação (PARK *et al.*, 1999).

Investigação de um surto associado com charque mostrou que *E. coli* O157:H7 sobrevive por mais de 13 meses neste meio a temperatura ambiente. Outros estudos revelaram que o sorotipo O157:H7 tem uma vagarosa diminuição populacional à dessecação em 51,7°C. (MENG; DOYLE, 1998)

Muitos informes refletem a grande ubiquidade das cepas STEC. A grande persistência e resistência destes organismos em componentes do ambiente como: solo, vegetação, superfície e sedimentos de coleções hídricas determinam considerável risco para populações humanas (DUFFY *et al.*, 2001).

E. coli O157:H7 foi isolada de água superficial não clorada e pode sobreviver muitas semanas nesse meio, principalmente em baixas temperaturas. O organismo exige nutrientes mínimos para sobreviver, todavia a competição por nutrientes e

atividades antagônicas de outros microrganismos afetam a sobrevivência da bactéria no meio aquático (MENG; DOYLE, 1998 e PARK *et al.*, 1999).

Entre as implicações epidemiológicas do grande tempo de sobrevivência de STEC na água inclui-se a maior possibilidade de expansão da contaminação ambiental, infecção de rebanhos e animais silvestres com maior risco de contaminação de alimentos irrigados (DUFFY *et al.*, 2001).

Um recente estudo sobre a sobrevivência da *E. coli* O157:H7 em água clorada mostrou que o sorotipo desaparece em 30 segundos após tratamento com produtos contendo 0,2 mg/l de cloro residual (PARK *et al.*, 1999).

Estudos epidemiológicos indicam que a mais provável origem da contaminação de águas superficiais pelo sorotipo O157:H7 inclui o esterco bovino e também fezes de crianças pequenas sem hábitos higiênicos desenvolvidos (PARK *et al.*, 1999).

Um estudo de sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em fezes de bovinos no ambiente demonstra que este patógeno sobrevive a 5° C por 63 a 70 dias em meio úmido. Cepas STEC podem sobreviver no couro de animais infectados, representando um risco significativo de infecção em rebanhos e trabalhadores rurais e de matadouros (DUFFY *et al.*, 2001).

A habilidade de sobrevivência na pastagem representa uma grande oportunidade de transmissão nos rebanhos. A conversão de pastagem em silagem representa um meio menos favorável para sobrevivência da bactéria e é uma estratégia para diminuir o espraio do agente nos rebanhos. O número de bactérias é reduzido rapidamente durante o processo de fermentação e estocagem. Entretanto, silagens mal feitas favorecem a rápida multiplicação e reinfecção dos

animais. Em termos gerais , a sobrevivência das cepas STEC por extensos períodos no pasto e em outros alimentos esta diretamente ligada a variações sazonais observadas em estudos de frequência de infecção em populações humanas e animais (DUFFY *et al.*, 2001).

3.12 Medidas De Controle

A Comissão Internacional sobre Especificações Microbiológicas para os Alimentos (ICMSF,1996) afirma que a multiplicação da *Escherichia coli* O157:H7 nos alimentos não é requisito prévio para a possibilidade de infecção , já que a dose infectante é bastante baixa. Isto significa que as medidas de controle realmente eficazes para a eliminação da bactéria nos alimentos são os tratamentos de efeito bactericida, como o cozimento, a esterilização , a pasteurização e a irradiação (SCHUCH, 1997)

Não é possível identificar todos os animais portadores de *E. coli* O157:H7 antes do abate e o couro é a principal fonte de contaminação das carcaças (DUFFY *et al.*, 2000 e HANCOCK *et al.*, 1998). A pratica do jejum prévio ao abate visa diminuir o risco de contaminação durante os procedimentos de abate. Entretanto vários estudos mostraram que animais em jejum excretam um maior número de bactérias, logo a prática do jejum prévio é provavelmente contra indicada (HANCOCK *et al.*, 1998).

Através da inspeção visual ante-mortem é possível identificar animais com o couro excessivamente contaminado por fezes , separando-os para um processo de lavagem mais apurado e procedendo ao sacrifício destes animais ao final do período de abate diminuindo o risco de contaminação cruzada. A redução da velocidade da

linha de abate favoreceria também as práticas higiênicas. Técnicas adequadas de remoção do couro , de oclusão do reto e evisceração são fundamentais na prevenção da contaminação de carcaças (DUFFY *et al.*, 2000).

Carcaças são normalmente resfriadas a uma temperatura na superfície de menos de 7°C durante 12 a 24 h . Nesse período o número de bactérias contaminantes pode decrescer , aumentar ou permanecer estável em função da temperatura , umidade relativa , velocidade do ar e espaçamento entre as carcaças. Estes parâmetros não foram ainda estabelecidos para se obter reduções significativas na contagem de *E. coli* O157:H7 (DUFFY *et al.*, 2000).

Vários tratamentos visando a descontaminação de carcaças incluindo o uso de frio (10 – 15° C), calor (15 – 40° C), altas temperaturas (75 – 85° C), lavagem, uso de ácidos orgânicos ou uma combinação destes procedimentos tem sido testados. O tratamento mais efetivo é a lavagem com água e ácidos orgânicos (DUFFY *et al.*, 2000)

Vários estudos tem recomendado o uso de ácidos orgânicos para reduzir populações de *E. coli* O157:H7. O uso de vapor associado ao ácido acético ou ácido láctico seguido da lavagem com água quente (pasteurização a vapor) em carcaças bovinas mostrou que estes procedimentos podem reduzir mas não eliminar a contaminação pelo sorotipo O157:H7, que apresenta incomum tolerância aos meios ácidos, limitando o uso destes tratamentos (HOLLINGSWORTH; KAPLAN, 1998). BRACKET *et al.* (1994) citados por SHUCH, (1997) comprovaram a ineficácia do tratamento da carne crua picada com ácidos orgânicos (acético, cítrico e láctico) em temperaturas de 20° C e 55° C para eliminação da *E. coli* O157: H7. NETTLES-CUTTER e SIRAGUSA (1994) citados por SHUCH, (1997) obtiveram resultados

similares quando testaram o efeito do tratamento com os mesmos ácidos orgânicos, em carcaças bovinas experimentalmente contaminadas com três diferentes cepas de *E. coli* O157:H7. Observaram ainda que diferentes graus de resistência aos ácidos eram demonstrados pelas diferentes cepas estudadas.

A carne moída é o produto cárneo de maior risco porque os patógenos da superfície da carcaça são inoculados no interior do produto no processo de moagem. A medida de controle primária é o adequado tratamento térmico (DUFFY et al., 2000). Estudos de inativação térmica para *E. coli* O157:H7 em carne moída tem revelado que o organismo não é termo-resistente, com valores “D” de 270, 45, 24, e 9,6 segundos em 57,2, 60,0, 62,8 e 64,5° C respectivamente. O organismo é mais termo-sensível que *Salmonella*. Tratamento adequado com temperatura interna de 68,3° C por alguns segundos mata a bactéria. Em 1997 o FDA (Food and Drug Administration) sugeriu o uso de 68,5°C por 15 segundos para o tratamento térmico de carne bovina moída (MENG; DOYLE, 1998).

Cepas STEC podem sobreviver ao processo de fermentação e persistir nos produtos com risco de provocar doença. O controle nesse caso envolve um período adicional de tratamento térmico e aumento no período de fermentação ou maturação, sendo necessária uma revisão nestas tecnologias (DUFFY et al., 2000).

A pasteurização é eficaz na eliminação da *E. coli* O157:H7. Leite pasteurizado e produtos lácteos tem sido implicados em infecções humanas, mas apenas em condições de inadequada pasteurização ou contaminação após a pasteurização (DUFFY et al., 2000, 2001).

Os produtos vegetais podem ser contaminados de diversas maneiras incluindo adubação com fezes bovinas e irrigação ou lavagem com água

contaminada. Os níveis de contaminação da superfície dos vegetais podem ser reduzidos pela lavagem. Em precárias condições sanitárias a lavagem pode difundir bactérias contaminantes para produtos previamente não contaminados (DUFFY *et al.*, 2000).

O uso de água clorada ajuda no controle , porém apesar de se mostrar eficiente sobre microrganismos em suspensão na água, os efeitos do cloro em bactérias aderidas na superfície dos vegetais é limitada (DUFFY *et al.*, 2000).

Em relação aos sucos de frutas os baixos níveis de contaminação na matéria prima crua podem ser concentrados no produto final. Várias substâncias preservativas tem sido avaliadas quanto a atividade antimicrobiana para *E. coli* O157:H7 em alimentos. ZHAO *et al.* (1993) citados por MENG e DOYLE (1998) determinaram que o uso de benzoato de sódio incrementa a taxa de eliminação da O157:H7 em suco de maçã , enquanto o sorbato de potássio tem pequeno efeito em populações de *E. coli* O157:H7.

O manejo ambiental , visando a alteração do meio tornando-o menos apropriado para *E. coli* O157:H7 é uma possibilidade de controle. A redução da transmissão entre populações animais diminuindo a sua densidade é uma medida possível e eficaz de diminuição da prevalência de *E. coli* O157:H7 (HANCOCK *et al.*, 1998 e DUFFY *et al.*, 2000).

O manejo adequado das fezes dos animais é importante para o controle da exposição ao patógeno limitando os riscos de infecção humana pelo contato direto nas atividades profissionais e de lazer em ambiente rural , também diminuindo o risco de transmissão entre os animais (DUFFY *et al.*, 2000).

O processo de fermentação na silagem corretamente realizado e o uso de ácidos orgânicos (ácido acético e propiônico) inibem a multiplicação de *E. coli* e tem mostrado resultados promissores (HANCOCK *et al.*, 1998 e DUFFY *et al.*, 2000).

Embora não existam estudos publicados tem sido sugerida a adoção da competição inibitória para o controle de *E. coli* O157:H7 em bovinos jovens. Competição inibitória consiste no estabelecimento de uma flora intestinal através de inoculação oral estratégica que seja resistente à colonização por determinado organismo (HANCOCK *et al.*, 1998).

3.13 Métodos de detecção

Os métodos para detecção da *E. coli* O157:H7 podem ser classificados em quatro categorias:

- a) Métodos de isolamento baseados nas características bioquímicas do sorotipo;
- b) Testes biológicos baseados nos efeitos citotóxicos causados por STX;
- c) Métodos imunológicos utilizando anticorpos policlonais e/ou monoclonais para antígenos de STX1, STX2, O157 e/ou H7;
- d) Métodos moleculares, pesquisando genes codificadores de STXs produzidos por cepas STEC ou outros fatores de virulência associados com a produção de STX pelo *E. coli* O157:H7 (PARK *et al.*, 1999).

Muitas características bioquímicas da *E. coli* O157:H7 tem sido utilizadas para desenvolver métodos de pesquisa baseados em cultura. As exigências nutricionais da *E. coli* O157:H7 produtora de toxina shiga são similares a de várias outras cepas de *E. coli* embora o sorotipo O157:H7 não fermente o sorbitol em 24h. O sorotipo O157:H7 pode ser identificado através das colônias sorbitol negativas no meio de

cultura ágar MacConkey sorbitol (SMAC) após 24h de incubação o que a diferencia de 95% das outras cepas de *E. coli* (DUFFY *et al.*, 2001 e PARK *et al.*, 1999). Embora cepas de *E. coli* O157:NM (não móvel) produtoras de STX e fermentadoras do sorbitol tenham sido isoladas na Europa (DUFFY *et al.*, 2001, STROCKBINE *et al.*, 1998 e SCHUCH, 1997). FENG (1995) informa que 25% das cepas de *E. coli* O157:H7 e O157:NM são capazes de fermentar o sorbitol. Cepas *E. coli* O157:H7 podem sofrer mutação passando a fermentar o sorbitol, fato observado em cepas isoladas em alimentos com adição de sorbitol utilizado como adoçante ou crioprotetor (SCHUCH, 1997).

E. coli O157:H7 também se diferencia pela inabilidade para produzir β - Glicuronidase que hidroliza 4 - metilumbelliferyl - β - D- glicurômide (MUG) e o pobre crescimento em temperatura de 44 - 45°C (SCHUCH, 1997, COHEN, 1996, DUFFY *et al.*, 2001, MENG; DOYLE, 1998 e STROCKBINE *et al.*, 1998).

Alternativamente, alguns laboratórios pesquisam a atividade da β - Glicuronidase em meio com MUG. Quando o substrato (MUG) é clivado com β - Glicuronidase, um produto fluorescente é formado. Uma vez que *E. coli* O157:H7 não produz β - Glicuronidase a prova é negativa, isto é, não detectável através de lâmpada ultravioleta (COHEN, 1996 e STROCKBINE *et al.*, 1998).

O ágar MacConkey sorbitol e o caldo lauril sulfato, adicionado de 4-metilumbeliferil-glicurômideo, são os meios de eleição para a realização das provas acima descritas (SCHUCH, 1997, HITCHINS *et al.*, 1992 e BOER; HEUVELINK, 2001)

Cepas O157 não móveis fermentadoras de sorbitol não podem ser detectadas com SMAC. O uso de SMAC para isolamento de cepas típicas de O157:H7 sorbitol

negativas pode apresentar resultados falso-positivos com organismos não – O157 sorbitol negativos como *Proteus* spp presentes em 10 a 20% das amostras fecais humanas (PARK *et al.*, 1999, COHEN, 1996 e STROCKBINE *et al.*, 1998). PARK *et al.*, (1996) determinaram a sensibilidade e a especificidade do SMAC em amostras fecais humanas em 82,4 e 100,0 % respectivamente, embora MARCH *et al.*, (1986) tenham definido uma sensibilidade de 100 % para SMAC em casos humanos de colite hemorrágica.

A inclusão de ramnose e cefixime um antibiótico cefalosporídeo, no SMAC auxiliaria a inibir estes organismos sorbitol negativos, porque 60% destes outros organismos não fermentam o carboidrato ramnose e *Proteus* spp é melhor inibido pelo cefixime que as cepas de *E. coli*. Este meio é denominado CR-SMAC (PARK *et al.*, 1999, STROCKBINE *et al.*, 1998, DUFFY *et al.*, 2001 e BOER; HEUVELINK, 2001)

Outro meio utilizado inclui cefixime e telurito de potássio (que inibe a multiplicação de cepas *E. coli* não – O157) ao SMAC, obtendo-se o CT-SMAC. Este meio permite o crescimento de cepas de *E. coli* O157:H7 e *Shigella sonnei*, mas inibe parcialmente ou completamente o crescimento de outras cepas de *E. coli* e todas ou muitas outras espécies de organismos sorbitol negativos (PARK *et al.*, 1999, DUFFY *et al.*, 2001, STROCKBINE *et al.*, 1998, SCHUCH, 1997 e BOER; HEUVELINK, 2001)

Os meios seletivos para pesquisa de *E. coli* O157:H7 tem sido avaliados em vários estudos, com resultados divergentes. SANDERSON *et al.* (1995) comparando SMAC e CT-SMAC para isolamento de *E. coli* O157 de fezes de bovinos concluíram que o CT-SMAC é o meio mais sensível de plaqueamento. CHAPMAN *et al.* (1994)

citados por DUFFY *et al.*, (2001) encontraram sensibilidades similares entre CR-SMAC e CT-SMAC para isolamento de *E. coli* de fezes de bovinos, embora o organismo seja mais facilmente obtido em culturas puras pelo meio CT-SMAC. ZADICK *et al.* (1993) citados por DUFFY *et al.*, (2001) informam que CT-SMAC incrementa a taxa de isolamento de cepas O157 de swabs retais de bovinos quando comparado com CR-SMAC. Contudo, HEUVELIK *et al.* (1997) citados por DUFFY *et al.*, (2001) não observaram diferença significativa de sensibilidade entre SMAC e CT-SMAC em plaqueamento da cepa BHI O157 e KARCH *et al.* (1996) citados por DUFFY *et al.*, (2001) não encontraram diferença na sensibilidade do CT-SMAC e o SMAC para isolamento da *E. coli* O157:H7 de fezes de crianças com SUH.

Mais de 100 sorotipos de *E. coli* produtoras de STX tem sido associados com doença em humanos (STROCKBINE *et al.*, 1998). Não existem características bioquímicas comuns que permitam distinguir cepas STEC pertencentes a sorogrupos não-O157 de cepas *E. coli* comensais (PATON; PATON, 1998 e COHEN, 1996). Uma vez que cepas não-O157 fermentam o sorbitol, SMAC, CT-SMAC ou CR-SMAC não são utilizados como meios seletivos no seu isolamento, embora cepas não-O157 cresçam bem no SMAC, MacConkey e outros meios que permitem a multiplicação de *E. coli* podendo ser utilizados em tentativas de isolamento (STROCKBINE *et al.*, 1998). A não existência de meios práticos para detecção de STEC não-O157:H7 impede a sua identificação na rotina (MENG e DOYLE, 1998) e não permite estabelecer estimativas de incidência e prevalência destas cepas em populações humanas e animais (NATARO; KAPER, 1998). Pelo fato de cepas não – O157 incluírem um número muito grande de sorogrupos a identificação com anti-soros para antígenos somáticos não é prática. O meio mais

utilizado para screening é a identificação da STX através das técnicas de cultura de células (STROCKBINE *et al.*, 1998).

Colônias O157:H7 isoladas através de técnicas de cultura devem ser confirmadas por reações bioquímicas, porque cepas de muitas espécies entre elas *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* e *Citrobacter freundii* fazem reação cruzada com anti-soro O157 (MENG; DOYLE, 1998 e STROCKBINE *et al.*, 1998). O sorotipo STEC mais comum em humanos na América do Norte e Reino Unido é O157:H7, entretanto mais de 12% das cepas sorogrupo O157 não são móveis e negativas na sorologia anti “H”, embora freqüentemente produzam STX e sejam muito similares à O157:H7. Acima de 3% das cepas O157 isoladas tem antígenos diferentes do H7, entre estes H4, H12, H16, H29, H39, H42, e H45. A sorologia para H7 pode ser de difícil execução porque os isolamentos exigem múltiplas passagens em meios para motilidade após a detecção do antígeno flagelar (STROCKBINE *et al.*, 1998 e COHEN, 1996).

A caracterização bioquímica define a identificação presuntiva para *E. coli* O157:H7. A motilidade é detectada pela turvação total do meio ou pelo crescimento além da linha de inoculação. Se a amostra é imóvel, o crescimento se restringe a linha de inoculação, enquanto o restante do meio permanece límpido. *E. coli* O157:H7 tem motilidade positiva. (SILVA *et al.*, 1997, SILVA, 1996 e TOLEDO *et al.*, 1982b)

O teste do indol objetiva verificar se a bactéria é capaz de desaminar o aminoácido triptofano, cuja molécula ao ser desaminada libera indol no meio de cultura. A desaminação do triptofano depende da disponibilidade pelas bactérias do complexo triptofanase. O indol pode ser detectado por reação química com o aldeído

presente no reagente de Kovacs para teste do indol (p-dimetilamino benzaldeído) que resulta em produtos de condensação coloridos. Esses compostos de cor vermelho-violeta ficam concentrados na fase alcoólica do reagente, formando um anel na superfície do meio de cultura líquida. *E. coli* O157:H7 é indol positiva. (SILVA *et al.*, 1997, SILVA, 1996 e TOLEDO *et al.*, 1982b)

O teste da lisina consiste em verificar se a bactéria é capaz de descarboxilar aminoácidos, formando aminas com a consequente alcalinização do meio de cultura. Nas etapas iniciais de crescimento, a utilização da glicose presente no meio vai provocar uma viragem ácida do indicador alterando a cor do meio de púrpura escura para amarelo. Posteriormente, após o esgotamento da glicose presente no meio, a utilização do aminoácido (lisina) vai elevar novamente o PH, revertendo a reação ácida. Assim, viragem ácida do indicador (cor amarela) indica resultado negativo, enquanto reversão da cor do meio para a condição original (púrpura escuro) indica resultado positivo. *E. coli* O157:H7 é lisina positiva. (TOLEDO *et al.*, 1982b e SILVA, 1996). A reação da L-triptofano desaminase determina a capacidade da bactéria em somente desaminar o L-triptofano, sem desprendimento da cadeia lateral, formando ácido indol pirúvico e amônia. O ácido indol pirúvico formado na presença de O₂ do ar e de íon Fe³⁺ existente no meio, interage com estes, formando um precipitado marrom do sal piruvato férrico. *E. coli* O157:H7 é LTD negativa. SILVA *et al.*, (1997), SILVA (1996) e TOLEDO *et al.*, 1982a)

E. coli O157:H7 fermenta a glicose produzindo gás formando bolhas observáveis no meio de cultura. As bactérias que fermentam a glicose acidificam o meio de cultura na base, virando o indicador azul de bromotimol para amarelo. *E.*

coli O157:H7 é glicose positiva.(SILVA *et al.*, (1997), SILVA (1996) e TOLEDO *et al.*, 1982a)

Vários aminoácidos presentes nas proteínas contém enxofre e muitas bactérias podem utilizá-los anaeróbicamente em seu metabolismo, o que resulta na produção de gás sulfídrico (H₂S). O ácido sulfídrico liberado reage com íons ferro formando um precipitado negro insolúvel. *E. coli* O157:H7 não produz H₂S. (SILVA *et al.*, (1997), SILVA, (1996) e TOLEDO *et al.*, 1982a)

O teste da urease objetiva verificar se a bactéria produz a enzima urease, responsável pela decomposição da uréia em amônia. A urease é uma enzima do grupo das amidases, que catalisam a hidrólise de amidas como a uréia, uma diamida do ácido carbônico ou carbamida. A hidrólise de cada molécula de uréia resulta em duas moléculas de amônia, que elevam o PH do meio de cultura e podem ser detectados pelo vermelho de fenol, um indicador de PH com ponto de viragem em PH = 8,4. Quando a bactéria produz urease e há alcalinização do meio o indicador vira para azul ou amarelo-esverdeado quando a reação é fraca. *E. coli* O157:H7 é urease negativa. (SILVA *et al.*, (1997), SILVA, (1996) e TOLEDO *et al.*, 1982a)

Escherichia hermanii é bioquimicamente muito similar a *E. coli* e é também sorbitol e MUG negativa. Por esta razão o teste de fermentação da celobiose é exigido para distinguir *E.hermanii*. *E. coli* O157:H7 é negativa e *E.hermanii* é positiva para celobiose. (STROCKBINE, 1998) *E. hermanii* quando semeada em ágar tripticase de soja (TSA) produz colônias de coloração amarela. (KONEMAN, 2001)

Métodos microbiológicos tradicionais são inadequados para a detecção de pequenos números de microrganismos com pequena dose infectante em presença de flora interferente abundante como ocorre em amostras fecais e alimentos

(SCHUCH, 1997 e DUFFY *et al.*, 2001). Sabe-se também que o CT-SMAC pode perder sensibilidade para detecção de *E. coli* O157:H7 em condições de estresse bacteriano como em alimentos uma vez que células estressadas sob a ação de calor, frio, acidez, e NaCl apesar de se apresentarem viáveis, são sensíveis ao cefixime e ao telurito (DUFFY *et al.*, 2001, PARK *et al.*, 1999 e MENG; DOYLE, 1998). AHMED e CONNER, (1995) citados por DUFFY *et al.*, (2001) demonstraram que SMAC é inadequado para recuperação de *E. coli* O157:H7 estressada por altas ou baixas temperaturas.

Em alimentos a recuperação efetiva de STEC O157:H7 estressada requer pré-enriquecimento não seletivo por 18 – 24h, similar ao método para detecção de *Salmonella*. Para ser efetivo, o enriquecimento de cepas O157 em alimentos necessita suprimir o crescimento de microflora competitiva, enquanto maximiza ao mesmo tempo o crescimento das cepas O157 em níveis detectáveis antes do uso dos métodos de cultura (DUFFY *et al.*, 2001).

A pequena dose infectante da *E. coli* O157:H7 exige o desenvolvimento de testes capazes de detectar pequenos números de células em alimentos, populações animais e ambiente (SMITH *et al.*, 1998).

Um método de separação imunomagnética foi desenvolvido para aumentar a sensibilidade de detecção da *E. coli* O157:H7 em alimentos. Partículas paramagnéticas cobertas com anticorpos anti O157 são adicionadas em meios de enriquecimento para alimentos. *E. coli* O157:H7 é capturada pelas partículas magnéticas e o complexo inteiro é removido pela aplicação de um campo magnético. *E. coli* O157:H7 é separada das partículas de alimento e de populações microbianas que podem interferir com os teste de detecção. I.M.S. incrementa a sensibilidade ao

concentrar um pequeno número de células *E. coli* O157:H7 de uma abundante microflora que pode crescer demais em meios seletivos como SMAC, CT-SMAC e CR-SMAC (DUFFY *et al.*, 2001 e CAPRIOLI; TOZZI, 1998). A separação imunomagnética também tem se mostrado um método sensível para isolamento de *E. coli* O157:H7 em amostras de carne inoculadas com culturas bacterianas e fezes bovinas natural e artificialmente contaminadas (DUFFY *et al.*, 2001)

O uso da separação imunomagnética (IMS) incrementa a recuperação de cepas O157 em relação ao plaqueamento direto, IMS é mais sensível que o plaqueamento direto com SMAC ou suas versões modificadas (CT-SMAC, CR-SMAC). IMS se mostrou superior inclusive aos métodos moleculares como PCR (Polimerase Chain Reaction) e testes de citotoxicidade (STROCKBINE *et al.*, 1998). A utilização de IMS é especialmente vantajosa em portadores assintomáticos e coletas de amostras fecais em período longo após o início dos sintomas (STROCKBINE *et al.*, 1998). Cepas O157:H7 são raramente excretadas mais de uma semana após o início dos sintomas em humanos, embora alguns pacientes possam eliminar a bactéria por três semanas e crianças pequenas por longos períodos após o final da doença (ARMSTRONG *et al.*, 1996). Estudos realizados em surtos por *E. coli* O157:H7 mostram que 50% dos isolamentos falham em seis a oito dias após o início dos sintomas (ARMSTRONG, 1996).

TARR *et al.* (1990) citados por ARMSTRONG *et al.*, (1996) publicaram estudo em casos de SUH onde a taxa de isolamento foi de 100% até dois dias do início da diarreia, 92% depois de três a seis dias e 33% após seis dias.

CHAPMAN *et al.* (1994) citados por SCHUCH (1997) avaliaram os resultados da IMS comparado com o cultivo direto com CR-SMAC e CT-SMAC para isolamento

de *E. coli* O157 verotoxigenica de fezes bovinas inoculadas com 12 diferentes cepas de *E. coli* O157 com contagens de $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$ e 10^6 UFC. O método de separação imunomagnética apresentou sensibilidade 100 vezes maior que o cultivo direto para a maioria das cepas testadas, com limites de detecção entre 10^2 e 10^3 UFC, para as cepas testadas.

KARCH *et al.* (1996) citado por SCHUCH, (1997) avaliaram os limites de detecção para seis diferentes cepas de *Escherichia coli* O157 em amostras de fezes humanas com 10^7 coliformes de flora interferente. Os métodos de cultivo direto em SMAC, semeadura em SMAC após pré- enriquecimento de 4h a 37°C, hibridização de colônia após plaqueamento de 4h a 37°C e PCR direto das fezes apresentaram como limite de detecção 10^5 UFC/g. O cultivo direto em CT- SMAC, 10^4 UFC/g. IMS com semeadura em SMAC, 10^3 UFC/g e IMS com semeadura em CT – SMAC, 10^2 UFC/g.

Isolamentos de cepas O157:H7 devem ser pesquisadas quanto à capacidade de produção de STX ou para a presença de genes codificadores de STXs. Infecções por STEC podem ser diagnosticadas por métodos biológicos, imunológicos ou por testes baseados no estudo de ácidos nucleicos. Deve-se pesquisar a presença de STX1, STX2 e suas variantes ou a presença dos seus genes codificadores (STROCKBINE *et al.*, 1998).

As toxinas shiga (STXs) produzem efeitos citopáticos característicos em células vero derivadas do rim de macacos verdes africanos e hela in vitro. Testes de neutralização utilizando anticorpos específicos, anti-STX1 ou STX2, neutralizando seus efeitos citotóxicos são métodos sensíveis e específicos para a detecção de infecções por cepas STEC (PARK *et al.*, 1999 e COHEN, 1996). A descoberta de

que as variantes da STX2 tem uma reduzida citotoxicidade para células hela indica a cultura em células vero como o método de escolha (STROCKBINE *et al.*, 1998).

Existem fatores limitantes com os testes de cultura celular pois exigem tempo e laboratórios muito especializados. Muitas cepas *E. coli* produzem pequenos níveis de citotoxina e não há consenso na interpretação de baixos títulos de atividade (COHEN, 1996). A citotoxina do *Clostridium difficile* é também ativa em células hela e vero exigindo a inclusão de anticorpos antitoxina do *C. difficile* nos testes de neutralização. (STROCKBINE *et al.*, 1998). Uma vantagem destas técnicas é que podemos identificar todos os microrganismos produtores de citotoxina, não se limitando a identificação do sorotipo O157:H7 (COHEN, 1996).

Pacientes com infecção por *E. coli* O157:H7 normalmente desenvolvem um alto nível de anticorpos (imunoglobulina A e M) para o lipopolissacarídeo de *E. coli* O157 (antígeno “O”) (SMITH *et al.*, 1998).

A formação de anticorpos tem um pico entre a segunda e terceira semana da doença e nem todos os indivíduos infectados demonstram resposta. Estes testes tem maior utilidade, portanto, em estudos epidemiológicos de prevalência do que na identificação de doença aguda (COHEN, 1996).

Os métodos imunológicos incluem: testes de cultura de células para medir o nível de anticorpos neutralizadores de toxina. Enzimaimunoensaios (EIA) como Elisa (Enzyme – Linked – immunosorbent – Assays) para detectar anticorpos contra o Lipopolissacarídeo (LPS) O157, ou anticorpos anti-STX e Western blote para detecção de anticorpos anti-LPS ou enterohemolisina e outros (COHEN, 1996, SMITH *et al.*, 1998 e PARK *et al.*, 1999). Provas EIAs (enzimaimunoensaios) para detecção de STXs tem capacidade de identificar outros sorogrupos que não O157 o

que representa uma vantagem desta técnicas em relação a SMAC. A desvantagem é que embora estes métodos possam detectar a produção de toxina pelos organismos, não permitem o isolamento dos agentes (STROCKBINE *et al.*, 1998).

Pelo fato de muitos indivíduos responderem imunologicamente para o antígeno LPS em infecções por cepas O157, testes para identificação destes anticorpos contra este antígeno são os mais extensamente utilizados no sorodiagnóstico. Estes métodos identificam cepas O157 fermentadoras de sorbitol, mas não podem discriminar cepas toxigênicas das não toxigênicas e não podem detectar cepas STEC não – O157. (STROCKBINE, 1998)

A pesquisa de anticorpos anti-STX não é freqüentemente utilizada uma vez que vários estudos indicam que apenas uma pequena proporção de pacientes (18 a 35%) ou animais experimentais infectados com cepas STEC desenvolvem títulos de anticorpos antitoxina (anti STX) e esses anticorpos aparentemente limitados à STX1 significando que um teste imunológico baseado na pesquisa destes anticorpos para diagnóstico de todas as infecções por STEC não é possível. (COHEN, 1996, STROCKBINE *et al.*, 1998)

Testes de hibridização do DNA e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são os dois principais métodos moleculares para detecção de *E. coli* O157:H7 e outras cepas STEC. (PARK *et al.*, 1999)

Muitos genes e seqüências de DNA como: *eae* (attaching and effacing); genes codificadores de toxinas Shiga (*stx*); plasmídio de 60 MDS e gene codificador de hemolisina (*hly-A*) tem sido alvo do desenvolvimento de provas para detecção de *E. coli* O157:H7 e outras STEC. (MENG; DOYLE, 1998)

Os métodos de detecção de genes codificadores das STXs são específicos para detectar bactérias produtoras de toxina shiga, mas não para o sorotipo O157:H7, uma vez que mais de 100 sorotipos de *E. coli* produzem as toxinas. As mesmas considerações são válidas para o gene *eae* que também está presente em cepas enteropatogênicas de *E. coli* (EPEC). Outra limitação destes métodos é a impossibilidade de isolamento do agente. (MENG; DOYLE, 1998 e PARK *et al.*, 1999)

Recentemente uma prova de PCR para detecção específica do sorotipo O157:H7 foi desenvolvida. O teste para detecção de um oligonucleotídeo de 18 pb é dirigido para uma região do gene *midA* que codifica a enzima β -glicuronidase específica para o sorotipo O157:H7, incluindo as variantes fenotípicas do sorotipo O157:H7. O mesmo pesquisador desenvolveu um teste que identifica os genes *stx* e *midA* de *E. coli* O157:H7 podendo identificar simultaneamente o sorotipo O157:H7 e o tipo de STX que ele codifica. Métodos moleculares tem limitações importantes, pois são complexos e caros para uso em laboratórios na rotina. (PARK *et al.*, 1999) O uso de técnicas de PCR para detecção direta em amostras de fezes é considerada menos eficaz que a aplicação em culturas bacterianas puras (isoladas em placas). A existência de inibidores não específicos foi pesquisada por THOMAS *et al.* (1994) citados por STROCKBINE *et al.*, (1998) em experimentos onde o número e a composição de organismos competidores é muito variável. Usando uma prova de PCR para detecção de *E. coli* O157:H7 diretamente de amostras de fezes encontraram um limite para detecção de 10^5 a 10^6 UFC/g de fezes.

4 METODOLOGIA

As análises laboratoriais deste trabalho foram realizadas no Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN) do Instituto de Saúde do Paraná (ISEP) nos setores de microbiologia clínica e microbiologia de alimentos.

4.1 Origem das amostras

As amostras foram obtidas no período de 14/5/2001 a 01/8/2001, em matadouro frigorífico da região metropolitana de Curitiba – PR, que recebe para abate animais de diversos municípios do Estado.

4.2 Tamanho da amostra mínima

Para o cálculo do tamanho da amostra foi utilizado o programa Epi info versão 6.0, um programa de processamento de texto, banco de dados e estatística para saúde pública do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) do governo federal dos EUA.

Foi estabelecido um nível de confiança de 95% e um erro tolerável de 2% para uma população amostral estimada de 4000 animais e uma prevalência esperada de 1% de animais infectados por *E. coli* O157:H7. A prevalência esperada foi estimada com base nos resultados do estudo de CERQUEIRA (2000) no Rio de Janeiro.

Definidos estes valores, o tamanho da amostra mínimo calculado foi de 93 animais.

4.3 Obtenção das amostras

A capacidade de processamento e análise das amostras do laboratório limitou o número de amostras a serem coletadas em dez animais por semana em duas coletas com cinco amostras cada uma. Foram coletadas 100 amostras de 100 animais em dez semanas no período de 14/05/2001 a 01/08/2001.

A escolha das unidades de amostra foi obtida por amostragem sistemática na linha de abate. O intervalo de seleção foi calculado pelo número de animais a serem abatidos na data da coleta dividido por cinco (número de amostras a serem coletadas em cada data de coleta). A determinação do início casual foi definido através de amostragem aleatória simples de um número do intervalo de seleção previamente calculado.

4.3.1 Amostras Fecais

As amostras fecais foram obtidas por swab retal na linha de abate previamente às manobras de incisão peri-anal para liberação desta extremidade do trato digestivo e oclusão do reto, utilizando swab de Rayon estéril. As amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio com meio de transporte Cary-Blair, adequado para bactérias Gram negativas e microrganismos anaeróbios. As amostras foram encaminhadas para o laboratório em um prazo máximo de cinco horas do momento da coleta.

4.3.2 Contaminação de Carcaça

O método utilizado para coleta de material visando a avaliação da contaminação da carcaça se baseia no “Manual para Teste de *Escherichia coli* para Verificação de Controle de Processos em Estabelecimentos de Abate de Bovinos e Suínos” do Serviço de Inspeção e Segurança de Alimentos (FSIS) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA).

A meia carcaça direita de cada animal sorteado para a coleta de fezes foi identificada e marcada no momento da coleta da amostra fecal. A coleta das amostras foi realizada 24h pós-abate nas câmaras frigoríficas de estocagem das carcaças. A coleta das amostras neste momento objetivou avaliar o risco de contaminação das carcaças durante todo o processo de abate, descontaminação e estocagem no estabelecimento. Foi utilizada a técnica de esfregaço de superfície não destrutiva adequada para carcaças de bovinos não utilizando tecidos excisados.

De cada carcaça foi obtida uma amostra composta, correspondente a 300 cm² de superfície da carcaça. Esta amostra foi obtida de três pontos distintos da face externa da carcaça, cada uma com 100 cm². A primeira na área do flanco da região do músculo oblíquo externo do abdome; uma segunda na área da região dianteira correspondente aos músculos peitorais ascendente e descendente e uma terceira, na região posterior na área dos músculos bíceps da coxa e semitendinoso. A delimitação das áreas de coleta foi feita com moldes de aço inox previamente esterilizados medindo 10 x 10 cm.

Para a obtenção do esfregaço foi utilizada esponja em espuma com densidade de 10Kg/cm³, medindo 5x5x2,5 cm e saco plástico para Stomacher com 9x15 cm previamente esterilizados. A esponja para coleta foi inicialmente hidratada

com 10 ml de solução tampão estéril de fosfato de Butterfield. Uma vez delimitada a área do swab com o molde de aço inox a esponja foi friccionada 10 vezes no sentido horizontal e 10 vezes no sentido vertical. Para as áreas correspondentes ao dianteiro e o flanco utilizou-se o mesmo lado da esponja e para o posterior o outro lado. Ao final do processo de coleta a esponja foi colocada em saco plástico estéril e foram adicionados outros 15 ml da solução tampão de Butterfield e o saco lacrado.

As amostras foram acondicionadas em isopor com gelo e transportadas imediatamente para o laboratório para o início do processo de análise duas horas após a coleta.

4.4 Cultura referencial

Foi utilizada como cultura referencial a cepa *Escherichia coli* O157:H7 933 cedida pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, laboratório de referência nacional.

4.5 Metodologia Analítica

As técnicas de análise utilizadas basearam-se nos métodos preconizados pelo Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - SP) através do “Manual Laboratorial de Agentes Patogênicos de Doenças Veiculadas por Alimentos” (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE , 2000) “Manual de Procedimentos para Diagnóstico de *Escherichia coli* Produtora de Toxina Shiga” do Ministério de Saúde da Argentina e do “Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera” do National Center for Infections Diseases (NCID) e Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Geórgia, USA.

4.5.1 Amostras Fecais

4.5.1.1 Fase de isolamento em meio seletivo

A pesquisa de *E. coli* O157:H7 em amostras de fezes foi realizada pelo plaqueamento direto em ágar MacConkey-sorbitol utilizado como meio enriquecido seletivo. As placas semeadas foram incubadas a 35°C por 24h. A formação de colônias não fermentadoras de sorbitol incolores foi identificada.

4.5.1.2 Fase de identificação presuntiva

Em placas onde cresceram colônias incolores não fermentadoras de sorbitol foram identificadas as colônias suspeitas que foram semeadas nos meios EPM e MILI para caracterização bioquímica e em ágar nutriente para análises posteriores, se necessário. Essas amostras foram incubadas em estufa a 35°C por 24h. O meio MILI é um meio utilizado para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. (TOLEDO *et al.*, 1982b) O meio EPM é uma modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. (TOLEDO *et al.*, (1982a)

4.5.1.3 Fase de caracterização complementar

As colônias com perfil bioquímico compatível, mantidas em ágar nutriente foram testadas através de prova sorológica para identificação do antígeno somático “O”, permitindo a classificação no sorogrupo O157. O anti-soro O157 foi fornecido pelo instituto Adolfo Lutz e a prova utilizada foi a aglutinação em placa.

4.5.1.4 Provas diferenciais para *Escherichia hermanii*

Provas sorológicas para identificação do sorogrupo O157 podem apresentar reações cruzadas para *E. hermanii*, sendo necessária a realização de provas diferenciais. As colônias suspeitas para *E. coli* O157 foram inoculadas em ágar Tripticase de Soja (TSA) e incubadas a 35°C /24h para observação da cor das colônias. Em seguida foi realizada a inoculação em água peptonada com azul de bromotimol suplementada com celobiose que foi incubada a 35°C /24h observando-se a formação de cor amarela no meio, indicativa de viragem ácida com PH = 6,8 caracterizando reação positiva para *E. hermanii*. Viragem alcalina com PH = 8,4 e cor azul escura é uma reação negativa e confirma a presença de *E. coli* O157:H7.

4.5.1.5 Caracterização do sorotipo O157:H7

Colônias positivas para *E. coli* O157 foram encaminhadas para o laboratório de referência, instituto Adolfo Lutz (São Paulo) para identificação do antígeno flagelar “H” , definição do sorotipo e testes para verificar a produção de toxinas shiga.

4.6 Contaminação da carcaça

4.6.1 Contaminação por *E. coli* genérica.

Para a avaliação do risco de contaminação da carcaça optou-se pela pesquisa de *E. coli* genérica que entre as bactérias de habitat reconhecidamente fecal, dentro do grupo dos coliformes fecais é a mais facilmente diferenciada.

4.6.1.1. Metodologia analítica

Aos sacos plásticos contendo as esponjas utilizadas para a realização do swab de carcaça com 25 ml da solução tampão do fosfato de Butterfield foram adicionados 225 ml de água destilada peptonada (ADPT) utilizada como meio de pré-enriquecimento e diluente, também fornecendo condições para a recuperação de células que foram possivelmente lesadas durante o processo de refrigeração da carcaça. Com a finalidade de obter a dispersão de células livres da bactéria, através da dispersão da amostra no diluente foi feita a homogeneização da amostra em “Stomacher” por 30 segundos.

Foram feitas duas diluições a 1:10 e 1:100 sendo inoculado 1ml de ambas as diluições em placas Petrifilm® para identificação de *E. coli* genérica que foram incubadas a 35°C e a 45°C por 24h.

4.6.2 Isolamento de *E. coli* O157:H7 em carcaça.

Para o isolamento de *E. coli* O157:H7 em superfície de carcaças foi utilizado o método descrito para a detecção de amostras fecais. As amostras de swab de carcaça adicionadas de 225 ml de água destilada peptonada tamponada (ADPT) utilizada como meio diluente e de pré-enriquecimento foram incubadas a 35°C por 6 a 8h e inoculadas em meio seletivo ágar MacConkey-sorbitol. A metodologia analítica não se diferenciou da utilizada para as amostras fecais a partir desta etapa.

Diagrama da metodologia analítica para identificação de *E. coli* genérica em carcaças

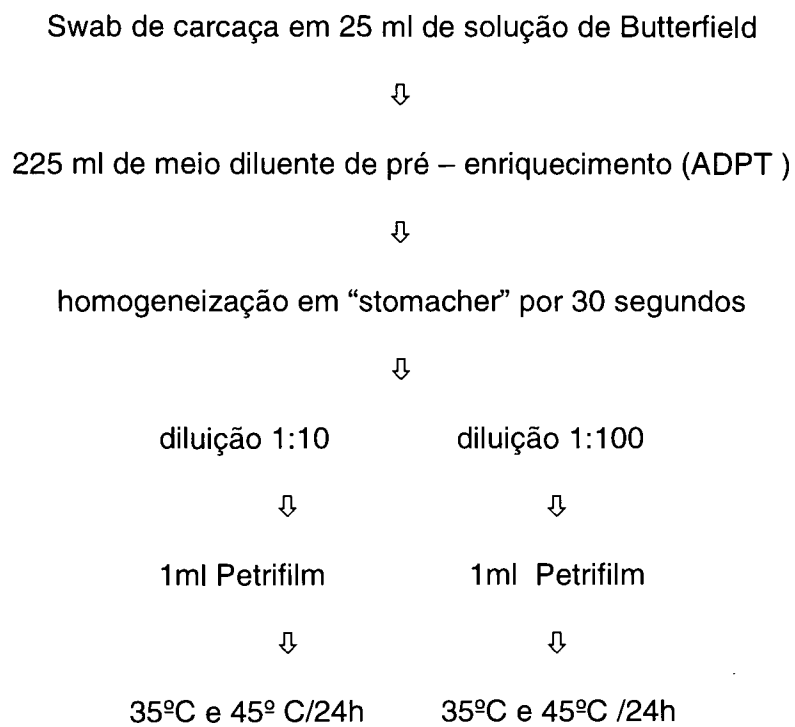


Diagrama da metodologia analítica para identificação de *E. coli* O157:H7 em amostras fecais

Swab retal

↓ 5 h (tempo máximo)

plaqueamento em meio seletivo ágar MacConkey – Sorbitol

↓ (35°C/24h)

isolamento e identificação das colônias sorbitol negativas

inoculação em meio MILI e EPM/caracterização bioquímica

↓ 35°C/24h

perfil bioquímico compatível com *E. coli* O157 :H7

lisina(+) indol (+) motilidade (+) LTD (-) glicose (+) H₂S (-) gás (+) uréia (-)

caracterização complementar = definição do sorogrupo com anti-soro O157

↓ 35°C/14h

diferenciação para *E. hermanii* / plaqueamento em meio TSA

inoculação em água peptonada com azul de bromotimol + celobiose

↓ 35°C/24 h

confirmação p/ *E. coli* O157 :H7



caracterização do sorotipo/ produção de STX (IAL)

DIAGRAMA DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE *E. coli* O157:H7 em SUPERFÍCIE DE CARCAÇA

Swab de carcaça em 25 ml de solução de Butterfield

↓ 2 h

Stomacher / 30 s

↓ 35°C / 8h

plaqueamento em meio seletivo ágar MacConkey – Sorbitol

↓ 35°C/24h

isolamento e identificação das colônias sorbitol negativas

inoculação em meio MILI e EPM/caracterização bioquímica

↓ 35°C/24h

perfil bioquímico compatível com *E. coli* O157 :H7

lisina(+) indol (+) motilidade (+) LTD (-) glicose (+) H₂S (-) gás (+) uréia (-)

caracterização complementar = definição do sorogrupo com anti-soro O157

↓ 35°C/14h

diferenciação para *E. hermanii* / plaqueamento em meio TSA

inoculação em água peptonada com azul de bromotimol + celobiose

↓ 35°C/24 h

confirmação p/ *E. coli* O157 :H7

caracterização do sorotipo/ produção de STX (IAL)

4.7 Análise dos dados

As prevalências pontuais na amostra (P) foram obtidas pela divisão da frequência (f) de positivos para *E. coli* genérica e *E.coli* O157:H7 na superfície da carcaça e nas amostras fecais pelo número de animais examinados (PEREIRA, 1995) :

$$p = f / n$$

A determinação da prevalência para um intervalo de confiança de 95 % foi obtida pela fórmula (PEREIRA ,1995) :

$$p \pm 2\sqrt{p(1-p)/n}$$

A sensibilidade e a especificidade do método (SMAC) utilizado na análise dos dados foram obtidas do trabalho de PARK et al.(1996) para o método SMAC em amostras fecais humanas :

Sensibilidade = 82,4 %

Especificidade = 100, 0%

A determinação da prevalência real foi obtida pela fórmula(MEDRONHO , 2002) :

$$Pr = p + esp - 1 / sen + esp - 1$$

onde :

Pr = prevalência real

p = prevalência obtida

sen = sensibilidade do método

esp = especificidade do método

A determinação do valor preditivo positivo (Vpr +) e valor preditivo negativo (Vpr -) foi obtida pelas fórmulas (PEREIRA , 1995) ; (MEDRONHO , 2002) :

$$Vpr + = VP / VP + FP * 100$$

$$Vpr - = VN / VN + FN * 100$$

onde :

VP = resultados falso positivos

VN = resultados verdadeiros negativos

FP = resultados falso positivos

FN = resultados falso negativos

Não foram encontrados valores de sensibilidade e especificidade para o método SMAC e método PETRIFILM® em alimentos para a pesquisa de *E. coli* O157:H7 e *E. coli* genérica respectivamente, impossibilitando os cálculos de prevalência real e dos valores preditivos positivo e negativo.

5 RESULTADOS

5.1 PREVALÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EM AMOSTRAS DE FEZES

A população amostral somou 3257 bovinos distribuídos em 117 lotes deferentes. O número de animais por lote variou entre um e 150 com uma média de 28 animais por lote.

Foram amostrados 100 animais provenientes de 78 lotes. Uma única amostra fecal (n.º 97) foi positiva para *E. coli* O157:H7. Este animal positivo fazia parte de um lote de 43 animais oriundos de uma fazenda de criação de gado de corte do município de Ponta Grossa – PR. Deste lote foi coletada uma amostra de um segundo animal que resultou negativa.

A prevalência observada foi de 1,0% . A prevalência para o intervalo de confiança de 95 % variou entre 0,0 e 3,0 %.

Considerando uma sensibilidade de 82,0% e uma especificidade de 100,0% com uma prevalência de 1,0 %, o valor preditivo positivo calculado foi de 100 % , ou

seja não ocorrem resultados falsos positivos. O valor preditivo negativo foi de 99,8% , ou seja ocorrem 0,2% de resultados falso negativos.

A prevalência real na amostra foi de 1,2% com variação no intervalo de confiança de 95 % entre 0,0 e 3,0 %.

5.2 CONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS POR *E. COLI* GENÉRICA E *E. COLI* O157:H7

Entre as 100 carcaças pesquisadas para contaminação por *E. coli* genérica e *E. coli* O157:H7, 41,0% foram positivas para *E. coli* genérica e todas foram negativas para *E. coli* O157:H7.

A prevalência para *E. coli* genérica foi de 41,0 % e para o intervalo de confiança de 95 % variou entre 31,0 e 50,0 %.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO SOROTIPO O157:H7 EM LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA

A amostra n.º 97 positiva para *E. coli* sorogrupo O157 foi encaminhada para o instituto Adolfo Lutz (São Paulo – SP) onde teve o antígeno flagelar H7 identificado. Foi também identificado o gene *stx2* nessa cepa através da técnica de P.C.R..

6.DISSCUSSÃO

O presente estudo identificou a presença de *E. coli* O157:H7 potencialmente produtora de STX2 no rebanho bovino paranaense pela primeira vez, com uma prevalência de 1,0% (IC 95% 0,0 – 3,0)

A estratégia de pesquisa em matadouro em estudos populacionais com o objetivo de identificação do agente , justifica-se pela ampla disseminação do sorotipo em rebanhos bovinos mas apresenta limitações.

Os bovinos abatidos em matadouros são uma amostra selecionada não representativa dos rebanhos paranaenses, consequentemente a generalização dos resultados para a totalidade do rebanho não pode ser feita porque a pesquisa em grupo não escolhido aleatoriamente tem como consequência produzir estimativas que não correspondem às frequências realmente existentes na população.(PEREIRA, 1995).

Esta metodologia de pesquisa é útil para a obtenção de informações sobre a ocorrência ou não de um sorotipo e é um indicativo da magnitude e importância do problema. Os resultados deste estudo podem ser extrapolados com ressalvas para rebanhos bovinos de mesma origem geográfica normalmente abatidos em matadouros frigoríficos voltados ao mercado interno, não sendo provavelmente válidas inferências para os rebanhos abatidos em grandes frigoríficos de exportação, assim como para animais abatidos em pequenos matadouros municipais que constituem populações de referência bem específicas.

Os animais da população experimental são oriundos de 56 (14%) municípios do Estado de diversas regiões heterogêneas quanto a ecologia, práticas de manejo, densidade populacional e de alimentação nos rebanhos. Também é importante

lembrar que os animais da população experimental estavam divididos em 117 lotes de diferentes origens e destes, apenas 78 (67%) tiveram pelo menos um animal pesquisado em decorrência da metodologia de amostragem sistemática empregada.

MECHIE *et al.* (1997) em um estudo de coorte de 15 meses em rebanho leiteiro na Inglaterra e CHAPMAN *et al.*, (1997) em um estudo de um ano em matadouro na Inglaterra encontraram maiores prevalências de *E. coli* O157:H7 na primavera e verão. Estudos recentes no Canadá e Holanda confirmam a ocorrência desta variação sazonal. (GANSCHROFF; O' BRIEN, 2000)

Não existem estudos no Brasil que informem se esta variação estacional também ocorre em nosso meio. É possível que nos Estados do Sul do Brasil com variações de temperatura e estações do ano bem definidas o padrão sazonal de prevalência também ocorra. O presente estudo com amostras coletadas em menos de três meses exclusivamente no final do outono e inverno não responde a esta questão. Admitindo-se contudo, uma certa similaridade climática da região centro sul do Paraná com a Europa e América do Norte é possível esperar uma maior prevalência de *E. coli* O157:H7 em meses quentes em nosso rebanho bovino.

As características epidemiológicas da *E. coli* O157:H7 em rebanhos bovinos é determinante para os resultados de estudos de prevalência. Assim, apenas alguns animais de um determinado rebanho são portadores da bactéria e a excreção é transitória limitada a menos de dois meses não existindo portadores crônicos. A bactéria é patogênica apenas para animais jovens sendo os animais em idade de abate portadores sãos. A prevalência da infecção é maior em bezerros, que também apresentam uma maior excreção da *E. coli* O157:H7 que os animais adultos. Além disso, a prevalência da *E. coli* O157:H7 é maior em bovinos de aptidão leiteira do

que em animais de corte. Considerando que, em sua maioria os bovinos enviados para abate em matadouros com serviço de inspeção veterinária são animais aparentemente sadios, adultos e de raças especializadas para a produção de carne é de se esperar que as taxas de prevalência obtidas em matadouro sejam menores que as observadas nos rebanhos de origem dos animais da população amostral que formam na verdade um grupo selecionado e diferenciado em relação aos seus rebanhos de origem. Por outro lado devemos considerar as restrições alimentares prévias ao abate que favorecem a excreção da bactéria, a maior densidade dos animais durante o transporte e durante o tempo de espera nos currais de matadouros bem como o contato com animais de várias origens que são fatores de risco para infecção por *E. coli* O157:H7. A prevalência obtida em matadouros se constitui, em realidade, na resultante da interação desses múltiplos fatores.

Muitos estudos de prevalência no gado bovino tem sido publicados e grandes diferenças nos resultados tem sido observados. A não padronização dos métodos de pesquisa com características de sensibilidade muito variáveis limitam a sua comparabilidade.

O método de pesquisa clássico para *E. coli* O157:H7 em amostras de fezes é o plaqueamento direto em ágar MacConkey sorbitol (SMAC). MARCH *et al.*, (1986) ao avaliarem a validade do método encontraram uma sensibilidade de 100% para SMAC em fezes humanas semeadas com $10^3 - 10^4$ UFC/ml. No entanto, CHAPMAN *et al.*, (1996) definiram o limite de detecção para SMAC em 10^5 UFC/g em fezes humanas e SANDERSON *et al.*, (1995) estabeleceram esse limite para fezes de bovinos em $2,5 \times 10^3$ UFC/g.

GANSHEROFF e O' BRIEN (2000) citando ARMSTRONG *et al.* (1996) e WALLACE *et al.* (1999) informam que a excreção da *E. coli* O157:H7 em bovinos varia entre 10^2 e 10^6 UFC/g de fezes, significando que a cultura direta em SMAC identifica apenas uma fração dos animais portadores do sorotipo.

CHAPMAN *et al.* (1994) utilizando um meio de enriquecimento seguido de separação imunomagnética foram capazes de detectar *E. coli* O157:H7 em 84 (8,2%) de 1024 swabs retais de bovinos, enquanto o plaqueamento direto em CT-SMAC e CR-SMAC detectou apenas 23 (2,2%) positivos. Além disso SANDERSON *et al.* (1995) demonstraram que a análise de uma grande amostra de fezes bovinas (10g) confere maior sensibilidade que as pequenas amostras obtidas por swabs retais.

ARMSTRONG *et al.*, (1996) citando vários autores concluíram que as taxas de prevalência encontradas em estudos utilizando SMAC em plaqueamento direto ou com uso de meios de enriquecimento, são normalmente baixas. Assim, CLARKE *et al.* (1988) estudando gado de corte em matadouro na província de Ontário no Canadá encontraram 1,5% (3/200) de positividade em bovinos de corte e 0,5% (1/200) no gado leiteiro. WELLS *et al.* (1991) em Wisconsin (EUA) encontraram 0,37% (1/269) de prevalência no gado bovino em propriedades rurais. BLANCO *et al.* (1989) encontraram 1,79% (2/112) de positividade em bezerros sadios na Espanha. CHAPMAN *et al.* (1989) encontraram 0,97% (2/207) de positividade em bovinos amostrados em matadouro na Inglaterra. WELLS *et al.* (1991) em Wisconsin (EUA) encontraram uma prevalência de 6,4% (6/94) em novilhos e bezerros e nenhum caso (0/169) em bovinos adultos em uma fazenda associada a um surto e em propriedades limítrofes. SYNGE e HOPKINS (1992) identificaram 0,4% (5/1247)

de positividade em bovinos na Escócia. BLANCO *et al* (1993) estudando bezerros com diarreia na Espanha encontraram 0,51% (1/197) de positividade para *E. coli* O157:H7. SYNG *et al.* (1993) coletaram amostras de esterco bovino em uma fazenda associada com surto em humanos na Escócia e identificaram 1,19% (1/84) de positividade.

WELLS *et al.* (1991) ao pesquisarem a prevalência de *E. coli* O157:H7 em rebanhos leiteiros associados com casos humanos esporádicos nos Estados de Washington e Wisconsin (EUA) encontraram uma prevalência global de 2,3% (5/210) em bezerros, de 3,0% (12/394) em novilhos e de 0,15% (1/662) em animais adultos. HANCOCK *et al* (1994) identificaram 0,28% (10/3570) de positividade em gado leiteiro e 0,71% (10/1412) em gado de corte em rebanhos no Estado de Washington(EUA).

A comparação dos resultados acima expostos com o obtidos no presente estudo de 1,0% (1/100) de prevalência sugere uma situação epidemiológica similar à observada em outros países. É importante destacar que as maiores prevalências obtidas com metodologia similar referem-se a rebanhos associados com surtos em humanos, enquanto que os resultados obtidos em rebanhos em matadouros e em situações de normalidade epidemiológica se situam em torno de 1,0% de prevalência.

A utilização de métodos de pesquisa de maior sensibilidade tem permitido a identificação de prevalências significativamente maiores. CHAPMAN *et al.* (1993) utilizando o CR-SMAC (ágar MaCconkey sorbitol com cefixime e ramnose) durante investigação epidemiológica de surto por *E. coli* O157:H7 em Yorkshire (Inglaterra)

identificaram 4,0%(84/2103) de positividade em swabs retais de bovinos em matadouros locais.

CHAPMAN *et al.* (1997) ao pesquisarem *E. coli* O157:H7 em bovinos, ovinos suínos e aves no mesmo matadouro em Yorkshire na Inglaterra utilizando separação imunomagnética (IMS) seguida de plaqueamento em CT-SMAC encontraram 13,4% (246/1840) de positividade em bovinos de corte e 16,1% (268/1661) em bovinos leiteiros, determinando uma prevalência quatro vezes maior em relação a pesquisa anterior, embora em situação de normalidade epidemiológica.

ELDER *et al.*, (2000) encontraram uma prevalência geral de 28% (91/327) em bovinos de corte em quatro matadouros na região do meio Oeste dos EUA utilizando também a técnica de separação imunomagnética e semeadura em CT-SMAC. Alguns dos lotes de animais investigados nesta pesquisa apresentaram prevalências próximas a 80% e em um dos lotes pesquisados a prevalência foi de 100%.

MECHIE *et al* (1997) utilizando a mesma metodologia (IMS e CT-SMAC) em um estudo de coorte em rebanho leiteiro associado com infecção em humanos por *E. coli* O157:H7 encontraram prevalências de 14% em vacas em lactação, 40% em vacas fora do período de lactação, 56% em bezerros e 68% em novilhos. Esses dados nos permitem inferir que as prevalências em nossos rebanhos podem também ser significativamente maiores que 1,5% (3/197) encontrada por CERQUEIRA (2000) no Rio de Janeiro ou de 1,0% (1/100) no presente estudo.

O uso do plaqueamento direto em SMAC não é normalmente sensível para a detecção de *E. coli* O157:H7 em pequenas concentrações como ocorre em alimentos e amostras ambientais. (WRIGHT *et al*, 1994 e BOER e HEUVELINK, 2001)

O uso de SMAC não tem identificado o organismo em produtos cárneos, como constataram ARMSTRONG *et al.* (1996) citando RATNAM *et al.* (1986) que não identificou o sorotipo em 66 amostras de carne moída vendidas a varejo em New Founland, Canadá. O mesmo resultado foi obtido por READ *et al.* (1990) com 660 amostras de carne na indústria de alimentos em Ontário, Canadá, por SMITH *et al.* (1991) em 255 amostras de carne de aves no Reino Unido; por WILLSHAW *et al.* (1993) em 310 amostras de produtos de carne bovina em Londres e também por SOMADPOUR *et al.* (1994) em alimentos de origem marinha de Seatte (EUA) , todos citados por ARMSTRONG *et al.*, (1996).

TARR *et al.* (1999) pesquisaram 1400 amostras de carne bovina moída em Seattle (EUA) e não identificaram *E. coli* O157:H7.

CERQUEIRA *et al.* (1996) pesquisaram 105 amostras de carne moída crua no Rio de Janeiro e embora tenha identificado varias cepas *E. coli* produtoras de STX não identificaram o sorotipo O157:H7 utilizando SMAC.

SILVEIRA *et al.* (1999) estudaram 86 amostras de hambúrguer de oito indústrias do sul e Sudeste do Brasil utilizando Petrifilm® e PRS-MUG (Phenol red ágar, suplementado com sorbitol e 4 methylumbelliferyl-β-d- Glucoronide), não encontrando nenhuma amostra positiva.

TORTORELLO *et al.* (1998) ao compararem diversos métodos de detecção de *E. coli* O157:H7 em suco de maçã definiram o limite de detecção para SMAC sem uso de meio de pré-enriquecimento em 10⁵ UFC/ml.

ONQUE *et al.* (1999) ao avaliarem diversos métodos de detecção de *Escherichia coli* O157:H7 em brotos de rabanete e carne moída demonstraram que o método padrão ouro para alimentos é o uso de meio de enriquecimento mEC+n

(caldo modificado para *E. coli* suplementado com Novobiocina) em incubação a 42 °C por 18h seguido de separação imunomagnética (IMS) e plaqueamento em CT-SMAC, capaz de identificar 23,9 UFC/25g de carne moída ou 0,95 UFC/g.

No entanto, não apenas a sensibilidade dos métodos utilizados explica as dificuldades de isolamento de *E. coli* O157:H7 nos alimentos. CHAPMAN *et al.*, (2000) ao pesquisarem a presença do sorotipo em carne bovina moída e carne de ovelha em Yorkshire (Inglaterra) examinaram 5093 amostras em um ano de estudo coletando amostras em 81 pequenos açougues. Utilizando separação imunomagnética e SMAC isolaram *E. coli* O157:H7 em apenas 1,4% das amostras (72/5093). HEUVELINK *et al.* (1999) utilizando separação imunomagnética e SMAC isolaram *E. coli* O157:H7 em 1,1% (6/571) amostras de carne crua de suínos. Os mesmos autores não isolaram o sorotipo em 1011 amostras de leite cru utilizando o mesmo método. HEUVELINK *et al.*,(1998) Estes resultados sugerem que a bactéria é raramente encontrada em alimentos, mesmo em áreas de conhecida transmissão.

E. coli O157:H7 não foi isolada em nenhuma das carcaças amostradas no presente estudo, possivelmente pela baixa sensibilidade do método utilizado. Mesmo a amostra n.º 97 proveniente de animal positivo para *E. coli* O157:H7 e com presença de *E. coli* genérica contaminante (41,7 UFC / cm² a temperatura de incubação de 35°C e 71,6 UFC / cm² a 45°C) foi negativa para o sorotipo O157 possivelmente presente em níveis abaixo do limite de detecção do método.

TUTTLE *et al.* (1999) ao estudarem um grande surto de *Escherichia coli* O157:H7 no Oeste dos EUA associado ao consumo de hambúrguer de uma rede de lanchonetes chamou a atenção para a pequena dose infectante do sorotipo e para a necessidade da adoção de uma política de tolerância zero em relação a presença da

bactéria em alimentos. Uma outra conclusão importante da pesquisa foi a correlação encontrada entre a contagem de bactérias coliformes e a presença de *E. coli* O157:H7 no hambúrguer ($p= 0,04$) sugerindo que a adoção de indicadores de contaminação utilizando outros grupos de microrganismos poderiam ser úteis no monitoramento da contaminação dos alimentos por *E. coli* O157:H7 dado que a pesquisa direta deste sorotipo exige provas de alta sensibilidade

ELDER *et al.*, (2000) ao estudarem a correlação entre a prevalência de *E. coli* O157:H7 em swab retal de bovinos e a contaminação do couro e da carcaça em matadouros nos EUA demonstraram haver concordância entre o isolamento fecal em determinado animal e a contaminação do couro. Por sua vez, o couro contaminado por material fecal é uma das principais fonte de contaminação de carcaças por coliformes fecais. Sugere-se também que o agrupamento dos animais em veículos de transporte e nos currais de matadouros favorece a contaminação cruzada aumentando a prevalência de positividade no couro em relação a prevalência fecal.

Existe também uma correlação positiva entre a prevalência em fezes e no couro e a prevalência de carcaças contaminadas. A prevalência de contaminação pode ser muito alta na fase de retirada do couro na fase pré evisceração, mesmo em carcaças de animais com amostras de fezes negativas para O157:H7 sugerindo contaminação cruzada. Em matadouro muitos mecanismos podem explicar esse processo de contaminação durante os procedimentos de abate: através dos manipuladores, facas, superfícies e outros equipamentos contaminados. Carcaças contaminadas em contato com outras carcaças na linha de abate e nas câmaras de resfriamento podem disseminar a bactéria. (ELDER *et al.*, 2000)

No presente trabalho avaliou-se o risco de contaminação por *E. coli* O157:H7 de carcaças através de um indicador de contaminação por matéria fecal. Atualmente *E. coli* genérica é considerada o melhor indicador de contaminação fecal em alimentos e ambiente. Os coliformes totais envolvem espécies de bactérias não entéricas como *Serratia* e *Aeromonas*. Entre os coliformes fecais que incluem três gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* os dois últimos incluem cepas de origem não fecal. O isolamento de uma cepa de *E. coli* O157:H7 em amostra fecal de bovino no presente estudo implica na possibilidade de contaminação de carcaças e justifica a adoção desta metodologia em matadouros.

Considerando a pequena dose infectante para *E. coli* O157:H7 assume-se que qualquer contaminação por matéria fecal em alimentos implica em risco de infecção e doença para seres humanos. Nesse sentido, a grande prevalência de carcaças contaminadas em algum grau por *E. coli* genérica identificada no presente estudo de 41,0% (IC 95 % 31,0 – 50,0 %) indica alto risco de contaminação para cepas patogênicas como *E. coli* O157:H7, mesmo em matadouros com inspeção veterinária.

Um dado importante do ponto de vista epidemiológico , é a confirmação da capacidade de produção de toxina shiga tipo 2 (STX2) pela cepa de *E. coli* O157:H7 isolada da amostra n.º 97. Este achado sugere a possível ocorrência de casos de infecção humana por *E. coli* O157:H7 no Estado do Paraná.

7. CONCLUSÕES:

- *E. coli* O157:H7 produtora de toxina Shiga esta presente no rebanho bovino paranaense.
- Considerando as limitações metodológicas do presente estudo é possível inferir uma maior prevalência para o sorotipo O157:H7 no rebanho bovino do que a identificada no presente trabalho.
- Existe risco de infecções humanas por *E. coli* O157:H7 veiculada por carne de origem bovina no estado do Paraná decorrente da contaminação de carcaças em matadouro.

8. RECOMENDAÇÕES

Para uma melhor avaliação da situação epidemiológica da *E. coli* O157:H7 sugere-se :

- Realizar estudos de prevalência com amostra representativa do rebanho bovino do Estado utilizando metodologia laboratorial com maior sensibilidade.
- Realizar estudos de coorte multicêntricos para avaliação do comportamento sazonal e dos fatores de risco para infecção por *E. coli* O157:H7 em rebanhos bovinos no Estado.
- Desenvolver estudos específicos em outras espécies animais para definição de seu papel na epidemiologia da *E. coli* O157:H7.
- Pesquisar a ocorrência e frequência de outros sorotipos STEC em bovinos e outras espécies.
- Desenvolver pesquisas sobre a ocorrência de *E. coli* O157:H7 e outros sorotipos STEC em alimentos de alto risco.
- Implantar a avaliação de risco de contaminação por *E. coli* O157:H7 em carcaças de bovinos e outras espécies através da pesquisa de *E. coli* genérica em matadouros.
- Ampliar a rede de matadouros com inspeção veterinária no Estado do Paraná
- Implantar a vigilância epidemiológica da colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica no Estado do Paraná.

REFERÊNCIAS

- ACHESON, D. W. K.; LINCICOME, L. L.; JACEWICZ, M. S.; KEUSCH, G. T. Shiga toxin interaction with intestinal epithelial cells. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 140-147.
- AHMED, S.; DONAGHY, M. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in Central Scotland. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 59-65.
- ARPC. Regulamento de redução de patógenos. **Apêndice "F"**: manual para teste de *Escherichia coli* para verificação do controle de processos em estabelecimentos de abate de bovinos e suínos. p. 1-17. (Federal register, v. 61, n. 144, 25 jul. 1996.)
- ARGENTINA. Ministério de Salud. **Diagnóstico de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga**: manual de procedimientos. Buenos Aires, 2000.
- ARMSTRONG, G. L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS JUNIOR, G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v. 18, n. 1, p. 29-51, 1996.
- BENDER, J.; MEAD, P.; VOETSCH, D.; VUGIA, D.; FIORENTINO, T.; KOEHLER, J.; SHIFERAW, B.; GRIFFIN, P. **Hemolytic uremic syndrome (HUS) cases identified in the 1996 foodNet *Escherichia coli* O157:H7 surveillance**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodnet/pub/ieide/1998/bender_j_2.htm> Acesso em: 03 maio 2001.
- BENDER, J.; SMITH, K.; McNEES, A.; FIORENTINO, T.; SEGLER, S.; CARTER, M.; SPINA, N.; KEENE, W.; VAN GILDER, T.; EIP Food Net Working Group. **Surveillance for *E. coli* O157:H7 infections in foodnet sites, 1996–1998: no decline in incidence and marked regional variation**. Disponível em <http://www.cdc.gov/foodnet/pub/iceid/2000/bender_j.htm> Acesso em: 03 maio 2001.
- BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. *Escherichia coli* enterotoxigénicas, verotoxigénicas y necrotoxigénicas en alimentos y en muestras clínicas: papel de los animales como reservorio de cepas patógenas para el hombre. **Microbiología SEM**, Madrid, v. 11, p. 97-110, 1995.
- BOER, E.; HEUVELINK, A. E. **Evaluation of methods for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from foods and faeces**. Disponível em:<<http://www.research.teagasc.ie/vteceurope/>> Acesso em: 03 mar. 2001.
- CAGE, R.; CRIELLY, A.; BAYSINGER, M.; CHARNAK, E.; HERBERT, G.; JOHNSON, A.; FRASER, G.; RINEHADT, C.; SOLOMON, M.; WITHR, G.; BERMAN,

R.; MOLL, M.; RANKIN, J.; CARROL, J.; ETTINGER, M.; HENDERSON, S.; MISMAS, M.; PATEL, D.; REED, T.; SMITH, E.; WOZNIAC, J.; TONEY, D.; PEARSON, J.; HOFMANN, J.; GRENDON, J.; KOBAYASHI, J. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections among children associated farm visits --- Pennsylvania and Washington, 2000. **MMWR**, v. 50, n. 15, p. 293-297, Apr, 2001. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5015a5.htm>> Acesso em: 03 maio 2001.

CAPRIOLI, A.; TOZZI, A. E. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Continental Europe. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 38-47.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. Diagnosis and management of foodborne illnesses: a primer for physicians. **MMWR**, v. 50 n. RR-2, 2001. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/RR/RR5002.pdf>> Acesso em: 30 mar. 2001.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. **EpiInfo**: um sistema de processamento de texto, banco de dados e estatística para epidemiologia em microcomputadores. Atlanta, 1994. (Versão 6).

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. **Laboratory methods for the diagnosis of epidemic dysentery and cholera**. Atlanta, 1999.

CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Disponível em: <<http://www.vvm.cfsan.fda.gov/~mow/chap13.html>> Acesso em: 30 mar. 2001a.

CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. Enteroinvasive *Escherichia coli*. Disponível em: <<http://www.vvm.cfsan.fda.gov/~mow/chap16.html>> Acesso em: 30 mar. 2001b.

CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Disponível em: <<http://www.vvm.cfsan.fda.gov/~mow/chap14.html>> Acesso em: 30 mar. 2001c.

CERQUEIRA, A. M. F. ***Escherichia coli* produtora de toxina Shiga**: prevalência no reservatório animal, marcadores de virulência e análise da estrutura clonal. São Paulo, 2000. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

CERQUEIRA, A. M. F.; TIBANA, A.; GUTH, B. E. C. High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro city, Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 2, p. 177-180, 1997.

CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A. A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157

from cases of bloody diarrhoea, non-bloody diarrhoea and asymptomatic contacts. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 44, p. 267-271, 1996.

CHAPMAN, P. A.; SIDDON, C. A.; CERDAN MELO, A. T.; HARKIN, M. A. A one year study of *Escherichia coli* O157 in raw beef and lamb products. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 124, p. 207-213, 2000.

CHAPMAN, P. A.; SIDDON, C. A.; CERDAN MALO, A.T.; HARKIN, M. A. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 119, p. 245 – 250, 1997.

CHAPMAN, P. A.; SIDDON, C. A.; WRIGHT, D. J.; NORMAN, P.; FOX, J.; CRICK, E. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 111, p. 439–447, 1993.

COHEN, M. B. *Escherichia coli* O157:H7 infections: A frequent cause of bloody diarrhea and the hemolytic-uremic syndrome. **Advances in Pediatrics**, St. Louis, v. 43, p. 171-207, 1996.

CONTAMINACIÓN microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina y características socio-económicas de sus vendedores y consumidores. [S.I.]: OPA, 1996.

DEAN-NYSTROM, E. A.; BOSWORTH, B. T.; MOON, H. W.; O'BRIEN, A. D. Bovine Infection with Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 261-267.

DUFFY, G.; GARVEY, P.; WASTESON, Y.; COIA, J.; BLAIR, I. S.; McDOWELL, D. A. (Ed.). Control of verocytotoxigenic *E. coli*. Dublin: The National Food Center, 2000. Disponível em: <<http://www.research.teagasc.ie/vteceurope/controltech.htm>> Acesso em: 03 mar. 2001.

DUFFY, G.; GARVEY, P.; WASTESON, Y.; COIA, J. E.; MC DOWELL, D. A. (Ed.). Epidemiology of verototoxigenic *E. coli*. Dublin: The National Food Center, 2001. Disponível em: <<http://www.research.teagasc.ie/vteceurope/epitechbook.htm>> Acesso em: 03 mar. 2001.

ELDER, R. O.; KEEN, J. E.; SIRAGUSA, G. R.; BARKOCY-GALLAGHER, G. A.; KOOHMRAIE, M.; LAEGREID, W. W. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides and carcasses of beef cattle during processing. **PNAS**, v. 97, n. 7, p. 2999-3003, Mar. 2000.

ESCHERICHIA coli O157:H7 outbreak at a summer camp – Virgínia, 1994. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm4422.pdf>> Acesso em: 03 mar. 2001.

FENG, P. *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. **Emerging Infections Diseases**, v. 1, n. 2, Apr.-

June, 1995. Disponível em <<http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/feng.html>> Acesso em: 30 mar. 2001.

FROST, B.; CHAOS, C.; TENNEY, M.; MCWILLIAMS, D.; BARRET, E.; BRANCH, L.; JENKINS, S.; LINN, M.; TURF, E.; WOOLARD, D.; MILLER, G. B.; HENDERSON, S.; CAMPBELL, B.; MIMAS, M.; DVORAK, J.; PATEL, D.; PEERY, D.; MORANO, J.; CAMPBELL, K. *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak at a Summer Camp – Virginia, 1994. **MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report)**, v. 44, n. 22, p. 419–421.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Curso de diagnóstico laboratorial de agentes patogênicos de doenças veiculadas por alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2000.

GANSHEROFF, L. J.; OBRIEN, A. D. *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.A.: Higher prevalence rates than previously estimated. **PNAS**, v. 97, n. 7, p. 2959–2961, Mar. 2000.

GARBER, L. P.; WELLS, S. J.; HANCOCK, D. D.; DOYLE, M. P.; TUTTLE, J.; SHERE, J. A.; ZHAO, T. Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 207, n. 1, p. 46-49, 1995.

GRIFFIN, P. M. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in humans in the United States. In: KAPER, J. B.; O' BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin–producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C: ASM Press, 1998. p. 15–21.

GYLES, C. L. Vacines and Shiga toxin–producing *Escherichia coli* in animals. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin–producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 434-444.

HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E.; KINSEL, M. L.; TARR, P. I.; RICE, D. H.; PAROS, M. G. The prevalence of *Escherichia coli* O157.H7 in dairy and beef cattle in Washington State. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 113, p. 199–207, 1994.

HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E.; RICE, D. H. Ecology of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and impact of management practices. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin–producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 85-91.

HEDBERG, C.; ANGULO, F.; TOWNES, J.; HADLER, J.; VUGIA, D.; FARLEY, M.; CDC/USADA/FDA Foodborne Diseases Active Surveillance Network. **Differences in *Escherichia coli* O157:H7 annual incidence among foodnet active surveillance sites**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodnet/pub/vtec/1997/hedberg_c.htm> Acesso em: 03 maio 2001.

HEUVELINK, A. E.; BLEUMINK, B.; VAN DEN BIGGELAAR, F. L. A. M.; TE GIFFEL, M. C.; REUMER, R. R.; BOER, E. Occurrence and survival of verocytotoxin-

producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in the Netherlands. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 12, p. 1597-1601, 1998.

HEUVELINK, A. E.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M.; BEUMER, R. R.; BOER, E. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in the Netherlands. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 10, p. 1115-1122, 1999.

HITCHINS, A. D.; FENG, P.; WATKINS, W. D.; RIPPEY, S. R.; CHANDLER, L. A. *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA bacteriological analytical manual**. 8. ed. Gaithersburg: ADAC International, 1995. p. 01-29.

HOLLINGSWORTH, J.; KAPLAN, B. Food safety in the United States. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 109-118.

JUNEJA, V. K.; SNYDER JUNIOR, O. P.; MARMER, B. S. Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken: determination of D- and z-values. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, p. 231-237, 1997.

KAPER, J. B.; GANSHEROFF, L. J.; WACHTEL, M. R.; O'BRIEN, A. D. Intimin-mediated adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and attaching-and-effacing pathogens. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998a. p. 148-156.

KAPER, J. B.; ELLIOTT, S.; SPERANDIO, V.; PERNA, N. T.; MAYHEW, G. F.; BLATTNER, F. R. Attaching-and-effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998b. p. 163-182.

KARCH, H.; SCHMIDT, H.; BRUNDER, W. Plasmid-encoded determinants of *Escherichia coli* O157:H7. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 183-194.

KASSENBERG, H.; HEDBERG, C.; EVANS, M.; CHIN, G.; FIORENTINO, T.; VUGIA, D.; BARDSLEY, M.; SLUTSKER, L.; GRIFFIN, P. **Case-control study of sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infections in 5 foodnet sites (Calif., Conn., GA., Minn., Ore)**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodnet/pub/iceid/1998/kassenborg_h.htm> Acesso em: 03 maio 2001.

KAUR, J.; LEDWARD, D. A.; PARK, R. W. A.; ROBSON, R. L. Factors affecting the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, p. 325-330, 1998.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

LINGWOOD, C. A.; MYLVAGANAM, M.; ARAB, S.; KHINE, A. A.; MAGNUSSON, G.; GRINSTEIN, S.; NYHOLM, P. G. Shiga Toxin (verotoxin) binding to its receptor glycolipid. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 129-139.

LOPEZ, E. L.; CONTRINI, M. M.; DE ROSA, M. F. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in South América. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 30-37.

LYNN, T. V.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E.; HARRISON, J. H.; RICE, D. H.; STEWART, N. T.; ROWAN, L. L. The occurrence and replication of *Escherichia coli* in cattle feeds. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, n. 4, p. 1102-1108, 1998.

MAJKOWSKI, J. Strategies for rapid response to emerging foodborne microbial hazards. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, n. 4, p. 551-554, Oct.-Dec. 1997.

MARCH, S. B.; RATNAM, S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 23, n. 5, p. 896-872, May 1986.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report)**, Munich, v. 5, n. 5, Sept. 1999. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no5/mead.htm>> Acesso em: 03 mar. 2001.

MECHIE, S. C.; CHAPMAN, P. A.; SIDDON, C. A. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 118, p. 17-25, 1997.

MEDRONHO, R. A. et al. Estudos seccionais. In: MEDRONHO, R. A. **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 125-150.

MELTON-CELSA, A. R.; O'BRIEN, A. D. Structure, biology and relative toxicity of Shiga toxin family, members for cells and animals. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 121-128.

MENG, J.; DOYLE, M. P. Microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 92-108.

MICHINO, H.; ARAKI, K.; MINAMI, S.; NAKAYAMA, T.; EJIMA, Y.; HIROE, K.; TANAKA, H.; FUJITA, N.; USAMI, S.; YONEKAWA, M.; SADAMOTO, K.; TAKAYA, S.; SAKAI, N. Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM, 1998. p. 73-81.

MONNENS, L.; SAVAGE, C. O.; TAYLOR, C. M. Pathophysiology of hemolytic-uremic syndrome. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 287-292.

MONTENEGRO, M. A.; BÜLTE, M.; TRUMPF, T.; ALEKSIC, S.; REUTER, G.; BULLING, E.; HELMUTH, R. Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 28, n. 6, p. 1417-1421, June 1990.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 11, p. 142-201, 1998.

O'BRIEN, A. D.; KAPER, J. B. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 1-11.

OBRIG, T. G. Interaction of Shiga toxins with endothelial cells. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 303-311.

ONOUE, Y.; KONUMA, H.; NAKAGAWA, H.; HARA-KUDO, Y.; FUJITA, T.; KUMAGAI, S. Collaborative evaluation of detection methods for *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts and ground beef. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 46, p. 27-36, 1999.

PARK, C. H.; VANDEL, N. M.; HIXON, D. L. Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 directly from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 34, n. 4, p. 988-990, Apr. 1996.

PARK, S.; WAROBO, R. W.; DURST, R. A. *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 39, n. 6, p. 481-502, 1999.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 11, n. 1, p. 450-479, July 1998.

PEREIRA, M. G. Seleção dos participantes para estudo. In: _____. **Epidemiologia: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 337-357.

PEREIRA, M. G. Validade de uma investigação. In: _____. **Epidemiologia: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 326-336.

PEREIRA, M. M. Fatores de virulência microbiana. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Ed.). **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 3-29.

PREVENTING foodborne illness: *Escherichia Coli* O157:H7. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/publications/brochures/e_coli.htm> Acesso em: 30 mar. 2001.

PUBLIC health dispatch: outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and campylobacter among attendees of the Washington County Fair-New York, 1999. **MMWR Weekly**, v. 48, n. 36, p. 803, Sept. 1999. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/epo/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4836a4.htm>> Acesso em: 03 ago. 2000.

RASMUSSEN, M. A.; CRAY Jr., W. C.; CASEY, T. A.; WHIPP, S. C. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.114, p. 79-84, 1993.

RAY, P. E.; ONORIO, A.; SGROMO, J.; MAGLIO, S.; MARCO, I. XUE-HUI, L.; LIAN, X.; GALLO, G. E. Novel role of basic fibroblast growth factor in the pathogenesis of classic Hemolytic – Uremic Syndrome. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 312-322.

RIEMANN, H. P.; CLIVER, D. O. *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 14, n. 1, p. 41-48, Mar. 1998.

ROBINS-BROWNE, R. M.; ELLIOTT, E.; DESMACHELIER, P. Shiga toxin - Producing *Escherichia coli* in Australia. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 66-72.

ROSE, P.; CHANT, I. Hematology of hemolytic-uremic syndrome. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 293-302.

ROUQUAYROL, M.Z.; ALMEIDA FILHO, N. Doenças emergentes e reemergentes. In: _____. **Epidemiologia e saúde**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. p. 258-269.

SANDERSON, M. W.; GAY, J. M.; HANCOCK, D. D.; GAY, C. C.; FOX, L. K.; BESSER, T. E. Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 33, n. 10, p. 2616-2619, Oct. 1995.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado de Saúde. **Diagnóstico laboratorial de agentes patogênicos de doenças veiculadas por alimentos**. São Paulo, 2000.

SCHUCH, D. M. T. **Pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7 em cecos e carcaças de frangos de corte produzidos no Rio Grande do Sul, utilizando o sistema de separação imunomagnética.** Porto Alegre, 1997. 181 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SHERE, J. A.; BARTLETT, K. J.; KASPAR, C. W. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 64, p. 1390-1399, Apr. 1998.

SILVA, N. **Testes bioquímicos para identificação de bactérias em alimentos.** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996. (Informes técnicos, n. 1).

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 1997.

SILVEIRA, N. F. A.; SILVA, N.; CONTRERAS, C.; MIYAGUSKU, L.; BACIN, M. L. F.; KOONO, E.; BERAQUET, N. J. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburgers produced in Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 11, p. 1333-1335, 1999.

SMITH, H. R.; ROWE, B.; ADAK, G. K.; REILLY, W. J. Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* in the United Kingdom. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains.** Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 49-58.

SPIKA, J. S.; KHAKHRIA, R.; MICHEL, P.; MILLEY, D.; WILSON, J.; WATERS, J. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Canadá. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains.** Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 23-29.

STROCKBINE, N. A.; WELLS, J. G.; BOPP, C. A.; BARRET, T. J. Overview of detection and subtyping methods. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains.** Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 331-356.

TARR, P. I.; BILGE, S. S. Intimin-independent adherence mechanisms of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains.** Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 157-162.

TARR, P. I., TRAN, N. T.; WILSON, R. A. *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef in Seattle: results of a one-year prospective study. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 2, p. 133-139, 1999..

TAUXE, R. V. Emerging food borne diseases: an envolving public health challenge. **Emerging Infections Diseases**, Atlanta, v. 3, n. 4, p. 425-434, Oct.-Dec. 1997.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. EPM – modificação do meio Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir

de glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. **Revista Microbiol.**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 309-315, out.-dez. 1982.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. MILI – Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Revista Microbiol.**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 230-235, jul.-set. 1982.

TORTORELLO, M. L.; REINEKE, K. F.; STEWART, D. S.; RAYBOURNE, R. B. Comparison of methods for determining the presence of *Escherichia Coli* O157:H7 in apple juice. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 11, p. 1425-1430, 1998.

TUTTLE, J, GOMEZ, T.; DOYLE, M. P.; WELLS, J. G.; ZHAO, T.; TAUXE, R. V.; GRIFFIN, P. M. Lesson from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 112, p. 185–192, 1999.

*VARNAN, A. H. Consultant Microbiologist Southern Biological Reading. Food borne pathogens an illustrated text. Mosby Year Book, 1991

WARRNER, M.; KUO, K.; WILLIAMS, L.; ADAM, C.; LONGKOP, C.; RUDEN, R.; FRANCIS, B.; HAUPT, T. Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 – Illinois, 1995. **MMWR**, v. 45, n. 21, p. 437-9, 1995. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm4521.pdf>> Acesso em: 03 mar. 2001.

WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; WACHSMUTH, I. K.; RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; SOKOLOW, R.; MORRIS, G. K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 18, n. 3, p. 512–520, Sept. 1983.

WELLS, J. G.; SHIPMAN, L. D.; GREENE, K. D.; SOWERS, E. G.; GREEN, J. H.; CAMERON, D. N.; DOWNES, F. P.; MARTIN, M. L.; GRIFFIN, P. M.; OSTROFF, S. M.; POTTER, M. E.; TAUXE, R. V.; WACHSMUTH, I. K. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 29, n. 5, p. 985 – 989, May 1991.

WHITTAM, T. S. Evolution of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* Strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 195-209.

WILLSHAW, G. A.; SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; WALL, P. G.; ROWE, B. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 outbreaks in England and Wales, 1995: phenotypic methods and genotypic subtyping. **Emerging Infections Diseases**, Atlanta, v. 3., n. 4, p. 561-565, Oct.-Dec. 1997. WILSON, J. B.; McEWEN, S. A.; CLARKE, R. C.; LESLIE, K. E.;

WILSON, R. A.; WALTNER-TOEWS, D.; GYLES, C. L. Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 108, p. 423-439, 1992.

WHO. **Prevention and Control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Infections**. Geneva, 1997. (Report of a WHO Consultation, 28 april-1 may 1997)

WHO. **Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)**. Berlin: WHO, 1998. (WHO/CSR/APH/98.8).

WRIGHT, D. J.; CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A. Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 113, p. 31-39, 1994.

ANEXOS

ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO MACCONKEY sorbitol

Ágar MacConkey sorbitol

Fórmula	g/ litro
• Peptona	20,0
• Sorbitol	10,0
• Sais biliares Nº3	1,5
• Cloreto de sódio	5,0
• Vermelho neutro	0,03
• Cristal violeta	0,001
• Ágar	15,0

PH = 7,1 ± 0,2

ANEXO 2 – COMPOSIÇÃO DO MEIO CARY BLAIR

Meio de transporte Cary Blair

Fórmula	g/litro
• Fosfato dissódico	1,1
• Tioglicolato de sódio	1,5
• Cloreto de sódio	5,0
• Cloreto de cálcio	0,09
• Ágar	5,6
• Água destilada	1 litro

PH = 8,4

ANEXO 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO MILI**Meio MILI**

Fórmula	g/ litro
Extrato de levedura	3,0
Peptona	10,0
Triptona	10,0
L – lisina	10,0
Glicose	1,0
Ágar	2,0
Bromo cresol púrpura	0,02
Água destilada	1000 ml

PH = 6,5

ANEXO 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO E.P.M.

Meio EPM

SOLUÇÃO “A”

Fórmula	g / litro
• Triptona	10,0
• Extrato de carne	2,0
• Cloreto de sódio	5,0
• Fosfato de sódio dibásico	2,0
• L- triptofano	1,0
• Solução alcoólica de azul de bromotimol	2 ml
• Ágar	11,0
• Água destilada	1000 ml

SOLUÇÃO “B”

Fórmula	g / litro
• Citrato de ferro amoniacal	2,0
• Tiosulfato de sódio	2,0
• Glicose	10,0
• Uréia	40,0
• Água destilada	85 ml

PREPARO FINAL DO MEIO

1000 ml (solução “A”) + 17,5 ml (solução “B”)

PH = 7,0

ANEXO 5 – COMPOSIÇÃO DO MEIO A.D.P.T.**Meio ADPT**

Fórmula	g / litro
• Peptona	10,0
• Cloreto de sódio	5,0
• Fosfato dissódico	3,5
• Fosfato mono potássico	1,0

PH = 7,2 ± 0,2